



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Proliferación de células madre espermatogoniales de alpaca (*Vicugna pacos*) en presencia de matrices extracelulares

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga**

AUTOR

Maria del Pilar SUAREZ POCCORPACHI

ASESOR

Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Suarez, M. (2020). *Proliferación de células madre espermatogoniales de alpaca (Vicugna pacos) en presencia de matrices extracelulares*. Tesis para optar el título de Bióloga Genetista Biotecnóloga. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0001-9716-4965
DNI o pasaporte del autor	74159726
Código ORCID del asesor	0000-0002-8301-5536
DNI o pasaporte del asesor	06449624
Grupo de investigación	BIOTRA
Agencia financiadora	Perú Universidad Nacional Mayor de San Marcos Fondo de promoción de Trabajo de Tesis del Vicerrectorado de Investigación Aprobado con Código N° B18100184 con RR N°: 05969-R-18
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	- CIENCIAS BIOLOGICAS UNMSM LIMA: 12°03'35.2"S 77°04'55.7"W - CAMAL MUNICIPAL DE HUANCAMELICA 12°47'25.4"S 75°02'13.0"W
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2020
Disciplinas OCDE	Biología Reproductiva http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 14:05 horas del 26 de noviembre de 2020, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace uzy-znki-yzm, el jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **MARIA DEL PILAR SUAREZ POCCORPACHI**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20200028811, la titulando expuso su tesis: **“PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES DE ALPACA (*Vicugna pacos*) EN PRESENCIA DE MATRICES EXTRACELULARES**”, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19 , calificativo: Aprobada con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **MARIA DEL PILAR SUAREZ POCCORPACHI** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 15:25 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 26 de noviembre de 2020.

Mg. EDITH RODRIGUEZ QUISPE
(PRESIDENTA)



Firmado digitalmente por ARBAIZA
PRADO Lourdes Elena FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 26.11.2020 15:39:58 -05:00

Blga. ELENA ARBAIZA PRADO
(MIEMBRO)



Firmado digitalmente por VALDIVIA
CUYA Martha Esther FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 26.11.2020 15:36:24 -05:00

Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA
(ASESORA)

Blgo. JOSE LUIS PINO GAVIÑO
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

*A mis padres, Raymunda y Felimon, quienes son
mi principal fuerza para seguir adelante.*

*A mi hermana Rocio y Loky por más
momentos alegres.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mi hermana por siempre estar a mi lado, por alentarme en todo momento a seguir mis sueños y continuar con lo que quiero lograr en mi vida. Gracias por tantos momentos de risas y alegría; los quiero mucho.

A mi profesora la Dra. Martha Valdivia, por su orientación y asesoría. Agradezco su profunda confianza en mis habilidades y capacidades.

A mi amiga Cathy, mi compañera de tesis, quien además me brindo su apoyo desde que empezamos este trabajo. A Rubén por su ayuda y colaboración en las últimas semanas de este trabajo.

Al profesor Zezé Bravo por su apoyo, a Stefany, Emmanuel y Luz, quienes hicieron de este trabajo fueron menos angustioso. Gracias por remplazarlo con momentos de diversión y distracción.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción con quienes comparto el interés por la investigación. Gracias por su compañerismo.

Un especial agradecimiento al Fondo de promoción de Trabajo de Tesis del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento aprobado con RR N° 05969-R-18, Proyecto con código B18100184. Sin el cual no hubiese podido culminar este proyecto.

Muchas gracias a todos.

ABREVIATURAS

Aal	:	Espermatogonias tipo A alineada.
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico.
Apr	:	Espermatogonias tipo A pareada.
As	:	Espermatogonias tipo A sola.
BSA	:	Albúmina de suero bovino.
CF	:	Citometría de Flujo.
CO ₂	:	Dióxido de carbono.
CSF1	:	Factor estimulante de colonias tipo 1.
DBA	:	Aglutinina <i>Dolichos biflorus</i> .
DBA-FITC	:	DBA conjugado con isotiocianato de fluoresceína.
DMEM	:	Medio Eagle modificada de Dulbecco.
DPBS	:	Solución buffer con fosfato de Dulbecco.
EGF	:	Factor de crecimiento epidérmico.
FACS	:	Clasificación de células activadas por fluorescencia.
FGF2	:	Factor de crecimiento básico de fibroblastos.
FGFR3	:	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos.
g	:	gramos.
G	:	gravedades.
µg	:	microgramos.
GalNAc	:	Acetilgalactosamina.
GDNF	:	Factor neurotrófico derivado de células gliales.
GFRA1	:	Receptor Alpha-1 del factor GDNF.
IGF1	:	Factor de crecimiento insulínico tipo 1.
ITGA6	:	Integrina Alpha 6.
ITGB1	:	Integrina beta 1.
L	:	litros.
MEC	:	Matriz extracelular.

MEM	:	Medio mínimo esencial.
MF	:	Microscopia de Fluorescencia.
mg	:	miligramos.
mL	:	mililitros.
μL	:	microlitros.
MACS	:	Clasificación celular activada magnéticamente.
msnm	:	metros sobre el nivel del mar.
nm	:	nanómetros.
Oct4	:	Factor de transcripción homeodominio de la familia POU.
PBS	:	Buffer fosfato salino.
PGC	:	Células primordiales germinales.
pH	:	Potencial de Hidrógeno.
PLZF	:	Proteína promielocítica dedo de zinc.
PNA	:	Aglutinina de maní
PVP	:	Polivinilpirrolidona.
ROS	:	Especies reactivas de Oxígeno.
Rpm	:	revoluciones por minuto.
SFB	:	Suero fetal bovino.
SD	:	Desviación estándar.
SCC	:	Células Madres Espermatogoniales.
UCHL1	:	Ubiquitina carboxiterminal hidrolasa L1.
UNMSM	:	Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
°C	:	grados Celsius.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
ÍNDICE.....	vi
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS.....	xii
ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Camélidos Sudamericanos.....	3
2.2 La alpaca " <i>Vicugna pacos</i> "	3
2.2.1 Aspectos reproductivos	5
2.2.2 Importancia de las biotecnologías reproductivas en la mejora de la alpaca	6
2.3 Espermatogénesis	7
2.4 Células Madre Espermatogoniales.....	9
2.4.1 Caracterización de SSC	12
2.4.2 Conservación De Fertilidad y SSC	13
2.4.3 Cultivo de SSC	14
2.5 Métodos de Enriquecimiento de fracciones celulares.....	16
2.5.1 Gradientes de densidad de Percoll.....	17
2.6 Matrices Extracelulares.....	19
2.7 Lectina <i>Dolichos biflorus</i> aglutinina (DBA)	21
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23

3.1 Hipótesis.....	23
3.2 Objetivos	23
3.2.1 Objetivo General.....	23
3.2.2 Objetivos Específicos	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1 Materiales.....	24
4.1.1 Material Biológico	24
4.1.2 Medios de cultivo y reactivos.....	24
4.1.2.1 Medio de lavado de muestras biológicas.....	24
4.1.2.2 Medio de aislamiento de espermatozoides.....	24
4.1.2.3 Medio de aislamiento de células espermatogoniales	25
4.1.2.4 Medio de cultivo celular	25
4.1.2.5 Reactivos para concentración y viabilidad celular.....	26
4.1.2.6 Reactivos para purificación de células	26
4.1.2.7 Reactivos para la preparación de matrices extracelulares y DBA.....	26
4.1.2.8 Reactivos para la fijación de células.....	26
4.1.2.9 Reactivos para la evaluación de poblaciones celulares por CF y MF.....	27
4.1.3 Materiales de plástico, metal y vidrio.	27
4.1.4 Equipos de laboratorio	27
4.2 Metodología	27
4.2.1 Evaluación de parámetros espermáticos de las muestras biológicas.....	29
4.2.2 Aislamiento de Células Madre Espermatogoniales (SSC).....	29
4.2.3 Evaluación de viabilidad y concentración celular.....	30
4.2.4 Fijación de células	30
4.2.5 Purificación de células espermatogoniales aisladas por gradientes de Percoll	30
4.2.6 Preparación de las placas de cultivo con matriz extracelular y DBA	32
4.2.7 Cultivo y proliferación de células madre espermatogoniales <i>In vitro</i>	32
4.2.8 Evaluación mediante Citometría de Flujo y Microscopia de Fluorescencia	33
4.2.9 Análisis Estadístico.....	36
5. RESULTADOS.....	37

5.1	Parámetros Espermáticos	37
5.2	Aislamiento, concentración y viabilidad de Células Testiculares	38
5.3	Porcentaje de Células Madre Espermátogonias luego del aislamiento	40
5.4	Purificación de Células Madre Espermátogonias por gradientes de Percoll...	42
5.5	Comparación de los porcentajes de Viabilidad celular antes y después del enriquecimiento con gradientes de Percoll	43
5.6	Comparación de Porcentaje de SSC antes y después del enriquecimiento con Percoll por Citometría de Flujo y Microscopía de fluorescencia.....	44
5.7	Evaluación de Viabilidad celular durante el cultivo	48
5.8	Evaluación del porcentaje de Células Madre Espermátogonias luego del cultivo entre Grupos de Tratamiento.....	51
6.	DISCUSIÓN	55
7.	CONCLUSIONES	67
8.	RECOMENDACIONES.....	68
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
10.	ANEXOS	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de la espermatogénesis en una región del túbulo seminífero, en paréntesis el número de cromosomas. (Fuente: Jones y López, 2013)	8
Figura 2. Imagen modificada de la división de las espermatogonias en el modelo murino, el número en corchetes indica el número de células hijas generadas en cada división. (Fuente: Ehmcke et al., 2006)	10
Figura 3. Nicho de las SSC en el testículo de alpaca. Sc: Células de Sertoli, Sg: espermatogonia, PS: espermatocito paquiténico, RS: espermátidas redondas, ES: espermátida elongada. (Fuente Guo et al., 2013)	11
Figura 4. Representación esquemática de las gradientes discontinuas de Percoll (Fuente: Van Pelt et al., 1996)	18
Figura 5. Interacción entre las células madre espermatogoniales y la matriz extracelular del túbulo seminífero. (Fuente: De Rooij et al., 2008)	20
Figura 6. Flujograma de trabajo realizado por cada muestra evaluada.....	28
Figura 7. Ploteo de la población de células redondas (área verde) observadas por citometría de flujo. A. Muestra sin pasar por gradientes de Percoll, B. Muestra después de la purificación de Percoll	34
Figura 8. Imágenes de la fluorescencia de las tres poblaciones celulares diferenciadas por DBA-FITC por Citometría de Flujo. A. strong DBA positivas, B. weak DBA positivas, C. DBA negativas.	35
Figura 9. Evaluación por Microscopia de Fluorescencia. Células strong DBA positivas (flechas), weak DBA positivas (asterisco), DBA negativas (triángulo). Aumento 250X.	35
Figura 10. Correlación e índices de correlación entre variables. A. Concentración Espermática vs Promedio de peso testicular ($p>0.05$), B. Porcentaje de Viabilidad Celular vs Porcentaje de Viabilidad Espermática ($p>0.05$). r: Coeficiente de Pearson.	39

Figura 11. Correlación e índices de correlación entre variables. A. Porcentaje de SSC vs Concentración espermática ($p>0.05$), B. Porcentaje de SSC vs Promedio de peso testicular ($p<0.05$). r: Coeficiente de Pearson; p: Coeficiente de Spearman.....	41
Figura 12. Anillo obtenido luego de la centrifugación con gradientes de Percoll	42
Figura 13. Comparación de la viabilidad celular pre y post enriquecimiento con gradientes de Percoll.....	43
Figura 14. Imágenes de viabilidad celular por tinción con azul de Tripán. A. Pre Percoll, B. Post Percoll. Se observa células madre espermatogoniales vivas (flechas blancas), muertas (flechas negras), células somáticas (estrella), espermatozoides (asterisco) y eritrocitos (triángulo). Aumento 400X	44
Figura 15. Comparación de imágenes tomadas por Microscopía de Fluorescencia entre tratamientos. A. Pre Percoll, B. Post Percoll. Aumento 250X.....	45
Figura 16. Porcentajes de las tres poblaciones de células redondas caracterizadas con DBA-FITC (sDBA+, wDBA+ y DBA-) por Microscopía de Fluorescencia Pre Percoll (inicial) y Post Percoll.	46
Figura 17. Comparación de poblaciones celulares evaluadas por Citometría de Flujo. A. Pre Percoll, B. Post Percoll. DBA positivo: Células madre espermatogoniales, Early Dif: Células en diferenciación temprana, DBA negativo. Células diferenciadas.	47
Figura 18. Comparación de los porcentajes de las tres poblaciones caracterizadas por el DBA – FITC (sDBA+, wDBA+ y DBA-) Pre Percoll (inicial) y Post Percoll, evaluadas por Citometría de Flujo.....	48
Figura 19. Comparación de viabilidad celular en los días 3 y 6 de cultivo in vitro entre los cuatro grupos evaluados	49
Figura 20. Cultivos del Grupo Percoll (A), Grupo Gelatina (B) y Grupo DBA (C) en el día 3 (A1, B1, C1) y día 6 (A2, B2, C2) de cultivo, se observan colonias (Flechas azules). Aumento 400X (A), Aumento 100X (B, C).	50

Figura 21. Células cultivadas del Grupo Control. A. Día 3, B. Día 6. Células madres espermatogoniales (flechas), células somáticas (asterisco), colonias de células madre espermatogoniales (círculos azules). Aumento 400X.	51
Figura 22. Evaluación del Porcentajes de células madre espermatogoniales post cultivo entre los distintos grupos de Tratamiento evaluado por Microscopía de Fluorescencia.	52
Figura 23. Células evaluadas por Microscopía de Fluorescencia. A. Campo oscuro, B. Campo claro. Células solas (A1, B1) y colonias celulares (A2, A3, B2, B3). Aumento 250X.	53
Figura 24. Comparación de Porcentajes de células madre espermatogoniales post cultivo entre grupos de Tratamiento evaluados por Citometría de Flujo.	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes de los reactivos para la preparación de las gradientes de Percoll.	31
Tabla 2. Detalles de los grupos de tratamiento.....	32
Tabla 3. Tipos de poblaciones celulares utilizando DBA-FITC en Alpacas (<i>Vicugna pacos</i>).....	34
Tabla 4. Valores de los parámetros espermáticos de las muestras procesadas para el aislamiento de células testiculares.	37
Tabla 5. Concentración y Viabilidad de células testiculares aisladas de testículos de alpaca " <i>Vicugna pacos</i> ".....	38
Tabla 6. Media de los porcentajes de células madre espermato goniales en la suspensión de células testiculares	40
Tabla 7. Concentración y Viabilidad de células testiculares aisladas post enriquecimiento con gradientes de Percoll.....	42
Tabla 8. Porcentajes de Viabilidad celular obtenidos antes y después del enriquecimiento con Percoll.....	43
Tabla 9. Evaluación por Microscopia de Fluorescencia del porcentaje de Células madre espermato goniales, Células madre en diferenciación temprana y células diferenciadas pre Percoll (inicial) y post Percoll.	45
Tabla 10. Porcentajes de la población de Células Madre Espermato goniales, Células en diferenciación temprana y células diferenciadas caracterizadas con DBA-FITC y evaluadas por Citometría de Flujo en los tratamientos pre Percoll (inicial) y post Percoll.	47
Tabla 11. Porcentajes de viabilidad celular entre los grupos Control, Percoll, Gelatina y DBA en los días 0, 3 y 6 de cultivo In vitro.	49
Tabla 12. Porcentajes de Células madre espermato goniales post cultivo en los grupos Control, Percoll, Gelatina y DBA evaluadas por Microscopía de Fluorescencia.	52

Tabla 13. Porcentajes de Células madre espermatogoniales post cultivo en los grupos Control, Percoll, Gelatina y DBA evaluados por Citometría de Flujo.....	53
--	----

ANEXOS

Anexo N° 1. Camal Municipal de la ciudad de Huancavelica, Callqui Chico.	90
Anexo N° 2. Llegada de las muestras biológicas al Laboratorio de Fisiología de la Reproducción – UNMSM y pesaje de las muestras biológicas.....	90
Anexo N° 3. Aislamiento de células a partir de testículos de alpaca “ <i>Vicugna pacos</i> ”	91
Anexo N° 4. Cultivo y monitoreo de Células Madre Espermatogoniales.	91
Anexo N° 5. Parámetros espermáticos de las muestras empleadas de alpaca” <i>Vicugna pacos</i> ”.....	91
Anexo N° 6. Concentración celular y viabilidad celular de las muestras de pre Percoll y Post Percoll.....	91
Anexo N° 7. Porcentajes de las tres poblaciones caracterizadas por DBA-FITC antes y después del enriquecimiento con Percoll evaluadas por Microscopía de Fluorescencia.	91
Anexo N° 8. Porcentajes de las tres poblaciones caracterizadas por DBA-FITC antes y después del enriquecimiento con Percoll evaluadas por Citometría de Flujo.	91
Anexo N° 9. Porcentaje de viabilidad celular durante los días 3 y 6 del cultivo.	91
Anexo N° 10. Porcentaje de células espermatogoniales (sDBA+) después de 8 días de cultivo In vitro por Microscopía de fluorescencia.....	91
Anexo N° 11. Porcentaje de células espermatogoniales (sDBA+) después de 8 días de cultivo In vitro por Citometría De Flujo.....	91

RESUMEN

La importancia de las células madre espermatogoniales (SSC) radica en su capacidad de autorenovación y diferenciación, dando lugar a la espermatogénesis, es por esto que se busca la proliferación *In vitro* de este tipo de células ya que representan un pequeño porcentaje de la población celular en testículos de machos adultos y poderlas emplear en la preservación de especies. Debido a la problemática reproductiva que presenta la alpaca en sus condiciones naturales, el empleo de SSC de alpaca surge como una alternativa para conservar la genética de individuos de esta especie. En este contexto, el objetivo de este trabajo de investigación fue cultivar células madre espermatogoniales de alpaca en presencia de moléculas como la gelatina y DBA y evaluar cuál de los distintos métodos provee un mayor soporte para la proliferación de las SSC.

Se procesaron 12 pares de testículos de alpaca que fueron colectados en el Camal Municipal de Huancavelica (Aprox. 3,600 msnm), seleccionadas según la evaluación de sus parámetros espermáticos (concentración, viabilidad y movilidad espermática). Las suspensiones celulares obtenidas luego del aislamiento fueron purificadas por gradientes de Percoll y se evaluó la población de SSC por medio del marcaje con DBA-FITC por Microscopía de Fluorescencia (MF) y Citometría de Flujo (CF), obteniéndose un porcentaje de células madre espermatogoniales post Percoll de $49.68 \pm 10.9\%$ y $83.72 \pm 8.5\%$ por MF y CF, respectivamente los cuales fueron mucho mayor a sus respectivos iniciales de $22 \pm 5.45\%$ (MF) y $46.52 \pm 17.84\%$ (CF), siendo esta diferencia estadísticamente significativa por ambas metodologías ($p < 0.05$). Con respecto a la viabilidad celular no se ve afectada por el empleo del Percoll ($p > 0.05$), siendo $94.89 \pm 6.73\%$ y $91.33 \pm 6.58\%$ antes y después del Percoll, respectivamente. Las células obtenidas antes y después de la purificación fueron cultivadas en placas normales (Grupo control y Grupo Percoll, respectivamente) y en placas cubiertas con gelatina y DBA (Grupo gelatina y Grupo DBA, respectivamente).

Durante el monitoreo de los cultivos, la viabilidad celular entre grupos de tratamiento no se vio afectada significativamente ($p>0.05$), sin embargo, se observó disminución en la viabilidad entre días de cultivo siendo significativamente diferente entre el día 0 y 3 del cultivo para todos los grupos de tratamiento. Además, se observó la formación de colonias de SSC en todos los grupos al día 3 de cultivo, excepto en el Grupo control, donde la formación de estas fue mínima. Sin embargo, estas colonias empezaron a desaparecer al sexto día de cultivo.

Luego de 8 días de cultivo se evaluó el porcentaje de SSC entre los distintos tratamientos por MF y CF, obteniéndose un mayor porcentaje de SSC en el Grupo DBA ($63.28 \pm 5.61\%$ y $66.9 \pm 10.34\%$) y el menor para el Grupo Control ($44.48 \pm 6.34\%$ y $52.60 \pm 23.44\%$), siendo los porcentajes intermedios para el Grupo Percoll ($52.38 \pm 5.64\%$ y $57.95 \pm 20.2\%$) y Gelatina ($46.36 \pm 4.14\%$ y $53.05 \pm 17.73\%$). Siendo el primer porcentaje obtenido por MF y el segundo por CF, se encontró que el Grupo DBA muestra diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos por Microscopía de Fluorescencia ($p<0.05$), sin embargo, por Citometría de Flujo no se encontró diferencia significativa entre tratamientos ($p>0.05$). Se concluye que el empleo de gradientes de Percoll es un buen método para la purificación de SSC y que el empleo de la lectina DBA puede soportar la proliferación *In vitro* de SSC de alpaca.

Palabras clave:

Células madre espermatozonales, Percoll, alpaca, cultivo *In vitro*, DBA.

ABSTRACT

The importance of spermatogonial stem cells (SSC) lies in their capacity for self-renewal and differentiation, leading to spermatogenesis, which is why in vitro proliferation of this type of cells is sought since they represent a small percentage of the cell population in adult male testes and can be used in the preservation of species. Due to the reproductive problems presented by the alpaca in its natural conditions, the use of alpaca SSC arises as an alternative to conserve the genetics of individuals of this specie. In this context, the objective of this research work was to cultivate alpaca spermatogonial stem cells in the presence of molecules such as gelatin and DBA and to evaluate which of the different methods provides greater support for the proliferation of SSCs.

Twelve pairs of alpaca testicles were processed and collected at the Camal Municipal de Huancavelica (3,600 masl), selected according to the evaluation of their sperm parameters (concentration, viability and sperm mobility). The cell suspensions obtained after isolation were purified by Percoll gradients and the SSC population was evaluated with DBA-FITC labeling by Fluorescence Microscopy (MF) and Flow Cytometry (CF), obtaining a percentage of spermatogonial stem cells Post Percoll of $49.68 \pm 10.9\%$ and $83.72 \pm 8.5\%$ for MF and CF, respectively, which were much higher than their respective initials of $22 \pm 5.45\%$ (MF) and $46.52 \pm 17.84\%$ (CF), this difference being statistically significant by both methodologies ($p < 0.05$). Regarding cell viability, it is not affected by the use of Percoll ($p > 0.05$), being $94.89 \pm 6.73\%$ and $91.33 \pm 6.58\%$ before and after Percoll, respectively. Cells obtained before and after purification were grown in normal plates (Control Group and Percoll Group, respectively) and in plates covered with gelatin and DBA (Group gelatin and Group DBA, respectively).

During culture, cell viability between treatment groups was not significantly affected ($p > 0.05$), however, decrease in viability was observed between days of culture, being significantly different between day 0 and 3 of culture for all treatment groups. In addition, the formation of SSC colonies was observed in all groups on day 3 of culture, except in

the Control group, where the formation of these was minimal. However, these colonies began to disappear on the sixth day of culture.

After 8 days of culture, the percentage of SSC between the different treatments by MF and CF was evaluated, obtaining a higher percentage of SSC in the DBA Group ($63.28 \pm 5.61\%$ and $66.9 \pm 10.34\%$) and the lowest for the Control Group ($44.48 \pm 6.34\%$ and $52.60 \pm 23.44\%$), being the intermediate percentages for the Percoll ($52.38 \pm 5.64\%$ and $57.95 \pm 20.2\%$) and Gelatin Group ($46.36 \pm 4.14\%$ and $53.05 \pm 17.73\%$). Being the first percentage obtained by MF and the second by CF, it was found that the DBA Group shows significant difference with respect to the other treatments by Fluorescence Microscopy ($p < 0.05$), however, by Flow Cytometry no significant difference was found between treatments ($p > 0.05$). It is concluded that the use of Percoll gradients is a good method for the purification of SSC and that the use of DBA lectin can support the *in vitro* proliferation of alpaca SSC.

Keywords:

Spermatogonial stem cells, Percoll, alpaca, *In vitro* culture, DBA.

1. INTRODUCCIÓN

La alpaca es una especie de gran importancia para las zonas altoandinas del Perú. Según el Ministerio de Agricultura y Riego (Minagri), el Perú tiene el privilegio de ocupar el primer lugar en el mundo en la tenencia de alpacas y vicuñas y el segundo lugar en llamas, después de Bolivia. Nuestro país cuenta con 3 millones 685 mil 516 cabezas de alpacas (87% de la población mundial) de los cuales el 80% son de la variedad Huacaya, el 12% de la variedad Suri y el 8% son híbridos; Bolivia ocupa el segundo lugar con el 9.5% de la población mundial de alpacas. La crianza de alpacas se encuentra distribuida en 17 departamentos, siendo Puno y Cusco los que concentran la mayor producción con 1'459,903 y 545,454, respectivamente. Le siguen Arequipa (468,392); Huancavelica (308,586); Ayacucho (230,910) entre otras Regiones. Asimismo, somos los primeros productores de fibra de alpaca, alcanzando una producción anual que supera las cuatro mil toneladas y media; de las cuales un 95% es adquirida y transformada por la industria textil, exportándose el 58%; y el porcentaje restante es destinado a la artesanía y el autoconsumo. (CENAGRO, 2012).

La crianza de este animal involucra a 82.459 productores agropecuarios, es por eso que la alpaca contribuye a la economía familiar, la seguridad alimentaria y nutricional del poblador altoandino peruano, siendo la única fuente de ingreso los productos derivados de esta especie, como la carne, fibra, cuero, etc. (Quispe *et al.*, 2009). Además, representa un importante acervo cultural debido a su domesticación y crianza que datan de culturas prehispánicas (Yacobaccio, 2017), las características únicas que posee son resultado de su adaptación a la geografía y clima de nuestros andes (Yucra, 2017).

Más del 80% de la población nacional de alpacas se encuentra en poder de pequeños criadores, donde la crianza se caracteriza por la insuficiencia en el manejo de los recursos naturales. No existe división de la población de alpacas por raza, edad, sexo, etc. En muchos casos los rebaños son mixtos junto a llamas, ovinos y vacunos; tampoco existe un control de tratamientos antiparasitarios, por lo que enfrentan diversos problemas como la alta mortalidad de crías y la deficiente calidad de la carne debido a

la presencia de enfermedad parasitarias (Fernández, 2005). El empobrecimiento de las praderas de pastos naturales debido al sobrepastoreo, la baja calidad de la fibra debido a la falta de programas de selección; todo ello resulta en baja producción y pobre rentabilidad para el productor, lo cual repercute en su nivel de vida. Este sector de criadores es el más desprotegido, pero a la vez es que puede desarrollarse más debido a la población de alpacas que posee.

Poco más del 10% restante de la población de alpacas se encuentra en poder de medianas y grandes empresas, cooperativas, asociaciones, comunidades campesinas, etc. Estas tienen un enfoque empresarial por lo que generan una mayor rentabilidad y producción por encima del promedio. Poseen mayor conocimiento en el manejo reproductivo y control sanitario de esta especie, obteniendo material genético de mejor calidad (Fernández, 2005).

La selección artificial realizada por los pobladores para obtener un mayor predominio de la población de alpacas de fibra blanca disminuye drásticamente la variabilidad genética de esta especie (Montes *et al.*, 2013), y puede provocar la pérdida de diversidad genética, disminución de la calidad de fibra e incremento de defectos genéticos que afectan aspectos reproductivos debido a la endogamia, y conllevan a problemas en la economía del poblador andino (Sumar *et al.*, 1989). Estas malas prácticas sumadas a los varios factores limitantes que presenta la alpaca como un sistema reproductor con peculiaridades anatómicas y fisiológicas, en muchos casos desfavorables, nos lleva a desarrollar biotecnologías reproductivas que puedan usarse en programas de mejoramiento genético, de esta manera se permitiría la propagación de animales con características deseables, especialmente los que poseen fibra fina y de colores naturales (Quispe, 2005).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Camélidos Sudamericanos

Los camélidos sudamericanos son mamíferos herbívoros que pertenecen al orden Artiodactyla, suborden Tylopoda, familia Camelidae y tribu Lamini. Este grupo se encuentra representado por los camélidos silvestres: Vicuña (*Vicugna vicugna*) y Guanaco (*Lama guanicoe*); y los domésticos: Llama (*Lama glama*) y Alpaca (*Lama pacos*). Estas especies se caracterizan por no tener cuerno, labio leporino, glándulas metatarsianas, falta de marcado dimorfismo sexual, producción de una sola cría por ciclo reproductivo (Wheeler, 1991). El análisis cromosómico de estas especies indica un valor de $2n = 74$ cromosomas con semejanzas en la morfología cromosómica y patrones de bandeo. Además, se han observado casos de cruces entre especies (Smith *et al.*, 1994; Marin *et al.*, 2007).

Estos camélidos están distribuidos a lo largo de la Cordillera de los Andes, con mayor concentración en el altiplano peruano-boliviano, en alturas que van desde los 3600 y 5000 metros de altura. Siendo los países con mayor número de camélidos sudamericanos Perú y Bolivia, seguidos de Argentina, Chile y Ecuador; y en menor población Colombia y Paraguay. La crianza de estos animales constituye la actividad económica principal de los pobladores alto-andinos y la más rentable en la puna.

2.2 La alpaca “*Vicugna pacos*”

Anteriormente, la alpaca tuvo como nombre científico *Lama pacos*, siendo de esta manera agrupada junto al guanaco y la llama, pero estudios posteriores basados en técnicas clásicas de citogenética, evaluación por marcadores moleculares, como el citocromo b y ADN mitocondrial, demostraron que la vicuña y alpaca están estrechamente relacionadas, siendo la última descendiente directa de la vicuña, permitiendo así reclasificarla como *Vicugna pacos* (Marin *et. al*, 2007). La alpaca

puede habitar lugares de 4,500 metros de altura, logrando adaptarse a condiciones ambientales extremas.

Existen dos razas de alpacas: Huacaya y Suri. La alpaca Huacaya es la más abundante (Mayhua, 2011), posee un vellón denso y esponjoso con fibras finas, suaves, onduladas y de menor longitud (McGregor, 2006). La alpaca Suri tiene fibras de gran longitud más finas que la Huacaya con mechas espiraladas o rizadas que cuelgan a los lados del cuerpo (Pacheco, 2008).

Las características de la fibra de alpaca la hacen muy cotizada por su elasticidad, suavidad, sus propiedades térmicas, etc., además de la gama de colores que posee como el blanco, marrón, gris y negro (Crispín, 2008; Quispe *et al.*, 2009). La finura de la fibra de alpaca en promedio es de 28 micras, con lotes más finos de 22 a 25 micras conocidas como baby alpaca; y lotes gruesos de 30 micras que corresponden a la calidad denominada Huarizo (Fernández Baca, 1991; Paucar-Chanca *et al.*, 2019). Debido a la mayor demanda del mercado por la fibra de color blanco, es que existe un mayor predominio de los animales de este color en los rebaños (La Manna *et al.*, 2011), sin embargo, los colores naturales están siendo más apreciados por la industria textil por lo que se presenta la necesidad de conservar el material genético de la fibra de color (Fernández, 2005; Morante *et al.*, 2011).

La carne de alpaca presenta semejanzas con el valor nutricional de otras especies, incluso presenta mayor porcentaje de proteínas (21.88%) que la carne de bovino (17.5%) y menor contenido de colesterol (0.16%) con relación a otras especies (Hack, 2001; Cruz *et al.*, 2017). La carne sirve como base para muchos platillos peruanos y otra forma de consumirla es en su forma deshidratada “charqui”. Un subproducto de la alpaca es el estiércol que se emplea como fertilizante o combustible en las zonas altoandinas. Con la piel de estos animales se confecciona prendas de vestir y accesorios como carteras, billeteras, monederos, etc. a base de cuero (Avilés *et al.*, 2018). Debido a la amplia utilización de los productos y subproductos de la alpaca,

para el Perú es que se debe de apreciar y conservar este recurso genético en la actualidad.

2.2.1 Aspectos reproductivos

Las alpacas tienen un periodo de actividad sexual que va desde los meses de diciembre a marzo o abril, estos meses se caracterizan por presentar lluvias y mayor disponibilidad de pastos (Fernández, 2005). Sin embargo, la alpaca presenta varios factores limitantes para alcanzar una gran productividad debido a los bajos índices reproductivos. Se ha encontrado que el sistema reproductor de la alpaca macho presenta peculiaridades anatómicas y fisiológicas, como un tiempo variable para alcanzar la madurez sexual que en promedio es a partir de los tres años, diversas anomalías testiculares, desaceleración del crecimiento testicular que causan un déficit reproductivo a diferencia de otras especies (Sumar, 1991); un período de gestación demasiado largo, en la alpaca varía entre los 342 y los 345 días, a diferencia de la vicuña, que puede llegar hasta los 350 días (De Lamo, 2011). Entre los defectos testiculares más encontrados esta la hipoplasia testicular (9.9%), criptorquidismo (5.7%) y ectopia (2.5%), aumentando estas anomalías en machos sacrificados en camales a un 30.5% (Sumar, 1983). La adhesión del pene al prepucio (relacionada a la madurez sexual) varía desde el año hasta 3 años de edad, lo que retarda la madurez sexual, estas anomalías se deberían a diferencias genéticas, alimentación, cambios climáticos, etc. (Van Saun, 2008; Huanca *et al.*, 2012; Elzawam, 2013; Juyena *et al.*, 2013). La alta incidencia de estos trastornos testiculares resalta la necesidad de garantizar un examen completo reproductivo para la selección de machos reproductores (Tibary y Ruiz, 2018).

Las características del semen y la espermatogénesis de alpaca son un punto a tomar en cuenta para entender su baja tasa de fecundidad; la baja calidad espermática como los valores de movilidad (del 2 a 30% de eyaculados obtenidos

de machos normales puede ser azoospermico; Giuliano *et al.*, 2008) y concentración de espermatozoides, también conlleva a bajas tasas de fecundación en condiciones naturales. El semen de estos animales es altamente viscoso y se coagula después de la cópula, de manera que los espermatozoides adquieren movimientos oscilatorios en lugar de un movimiento progresivo para lograr la fecundación (Bravo *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 1999; Tibary y Vaughan, 2006, Pearson *et al.*, 2014). Algunos estudios han mostrado que el estrés térmico da como resultado cambios degenerativos en los túbulos seminíferos que conllevan a mayores anomalías en el eyaculado y menor concentración (Giuliano *et al.*, 2008; Schwalm *et al.*, 2007).

A nivel histológico la organización de los testículos de alpaca es similar a la de otros animales domésticos, los túbulos seminíferos aumentan en tamaño y empiezan a cubrirse por espermatozoides entre la edad de 1.5 a 2 años (Elzawam, 2013). Por otro lado, la producción de espermatozoides se correlaciona con el tamaño y peso testicular (Galloway, 2000). Sin embargo, el proceso y tiempo de espermatogénesis, la producción de espermatozoides, los tipos celulares presentes en los túbulos seminíferos y la relación de la producción de espermatozoides con los genes expresados por células germinales carecen de más estudios (Tibary y Vaughan, 2006).

2.2.2 Importancia de las biotecnologías reproductivas en la mejora de la alpaca

Los recientes avances en biotecnologías reproductivas de camélidos incluyen mejoramiento genético para incrementar el peso del vellón, obtener una fibra más fina (Quispe *et al.*, 2013) y establecer la uniformidad de color en los animales (Morante *et al.*, 2009). Incluso las investigaciones conllevan a identificar genes que están relacionados a el crecimiento de la fibra y al color de esta para mejorar la crianza y el manejo de esta especie (Mendoza *et al.*, 2019). Sin embargo,

existen limitantes como la poca disponibilidad de madres en edad reproductiva en los rebaños y la alta mortalidad de crías que llega con frecuencia al 50% (Fernández, 2005; Ratto *et al.*, 2011).

Las biotecnologías reproductivas como la fecundación *In vitro*, la inseminación artificial y la transferencia de embriones, son herramientas necesarias para el mejoramiento genético. Sin embargo, existen dificultades para poder aplicarlas en forma masiva, debido a la dificultad en la colección de semen (Bravo *et al.*, 2013). La criopreservación de espermatozoides también es una alternativa a la conservación del material genético (Santiani *et. al*, 2005), sin embargo, los parámetros espermáticos postdescongelamiento muestran porcentajes mucho menores a los iniciales, por lo que los estudios se han orientado a la conservación de otras células involucradas en la espermatogénesis.

Las células madre espermatogoniales (SSC, por sus siglas en inglés Spermatogonial Stem Cells) son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en células del linaje espermático, por lo que este tipo de células es esencial para la conservación de una especie y su diversidad genética (Oatley y Brinster, 2006). Sin embargo, debido a que representan un pequeño porcentaje de la masa testicular es que se han planteado técnicas como el cultivo *In vitro* para permitir su proliferación en condiciones controladas (Valdivia *et al.*, 2019b), además que el cultivo permite el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la espermatogénesis. Se ha visto que las SSC pueden ser utilizadas para generar animales transgénicos permitiendo el desarrollo germinal gracias a un donador en animales infértiles (Brinster y Avarbock, 1994; Wang *et al.*, 2014), por lo que el empleo de esta técnica sería de mucha utilidad en la alpaca.

2.3 Espermatogénesis

Es un proceso dinámico que ocurre en los túbulos seminíferos de los testículos a partir de la pubertad (inicio de la madurez sexual masculina), en el cual células

indiferenciadas dan lugar a células haploides diferenciadas especializadas como lo son los espermatozoides (De Rooij, 1998) y se divide en tres fases: fase proliferativa, fase meiótica y fase de espermiogénesis. En este proceso se ven implicados tres principales tipos celulares: Espermatogonias, encargadas de la proliferación; espermatocitos que inician el proceso meiótico y espermátidas que darán lugar a los espermatozoides, el cual es liberado al lumen del túbulo seminífero para su posterior maduración en el epidídimo (Hermo *et al.*, 2010). (Figura 1).

En la fase proliferativa las espermatogonias (localizadas en la membrana basal del túbulo seminífero) inician el proceso mitótico que produce dos tipos de célula: Espermatogonias tipo A que renuevan las células madre y tipo B. En la fase meiótica las células tipo B inician la meiosis y dan lugar a los espermatocitos primarios que pierden el contacto con la membrana basal, estos a su vez se dividen por meiosis en espermatocitos secundarios, los cuales generarán espermátidas (Riboldi, 2013). La fase de espermiogénesis es el proceso por el cual la espermátida pasa por cambios fisiológicos y morfológicos para dar lugar al espermatozoide que se encuentra en la zona adluminal del túbulo seminífero (Auger, 2008; Philips *et al.*, 2010). La duración del proceso de espermatogénesis es propia de cada especie, en ratón dura 35 días mientras que en ratas es de 52 a 53 días, en humanos 74 días y en vacas 63 días (Miao. 2010; Amann, 2008; Sahare *et al.*, 2018).

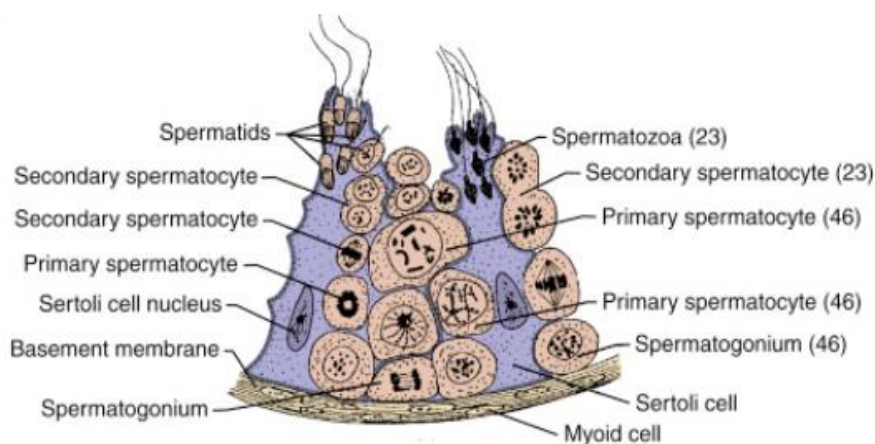


Figura 1. Fases de la espermatogénesis en una región del túbulo seminífero, en paréntesis el número de cromosomas. (Fuente: Jones y López, 2013)

2.4 Células Madre Espermatogoniales

Las células madre espermatogoniales derivan de las células primordiales germinales o PGC (Primordial Germinal Cells por sus siglas en inglés) durante el desarrollo embrionario (Lord y Oatley, 2017), estas células se mantienen en estado de quiescencia hasta que se inicia la madurez sexual. Son células madre adultas dentro del grupo de las espermatogonias (células heterogéneas con distintos grados de indiferenciación), que se encuentran en la membrana basal de los túbulos seminíferos (Orwig *et al.*, 2002) y en contacto directo con células de Sertoli (Guo *et al.*, 2012). Las células madre espermatogoniales (SSC) llevan a cabo la espermatogénesis, son células pluripotentes capaces de autorrenovarse y de producir millones de espermatozoides cada día, manteniendo así la integridad de la línea germinal (Hoffman, 2008); son las únicas células madre adultas capaces de heredar su material genético a la siguiente generación (Miao, 2011; Ning *et al.*, 2012), por lo que la manipulación genética de estas células es una potencial práctica que puede ser utilizada en una amplia diversidad de especies (Brister, 2007), incluso se ha mostrado que estas células pueden diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares como neuronas, adipocitos, osteoblastos, células epiteliales o células madre embrionarias en las condiciones óptimas (Mandanpour *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015). Sin embargo, conforman un mínimo porcentaje de la población total de células testiculares, en el caso de ratones adultos se ha encontrado que representan el 0.03% (Mohaqiq *et al.*, 2013), mientras que en bovino se ha observado un mayor porcentaje de estas células en testículos inmaduros (3 meses) que en los provenientes de animales adultos (Kitamura *et al.*, 2018b), los valores van desde el 8% al 15% del total de células testiculares (Herrid *et al.*, 2009).

Las espermatogonias pueden ser clasificadas en tipo A y B, en el caso de mamíferos no primates las espermatogonias tipo A se clasifican en A simple (As), A pareada (Apr) y A alineada (Aal). Se considera que las SSC son espermatogonias tipo As (Ehmcke *et al.*, 2006; De Rooij, 2015), cuando estas células empiezan el proceso de

división, aproximadamente el 50% de las As se dividen en Apr (unidas por un puente intercelular) y el restante en la renovación de las células As, manteniendo así el número de estas (Spradling *et al.*, 2011). Las posteriores divisiones de las células Apr darán lugar a las Aal, estas originan espermatogonias tipo A diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4), espermatogonias intermedias (In) y espermatogonias tipo B que dan lugar a los espermatozoides (Izadyar *et al.*, 2002; Miao, 2011; Figura 2).

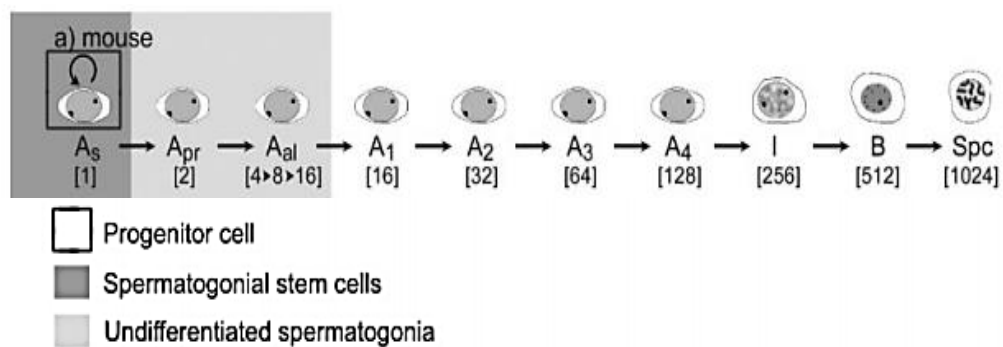


Figura 2. Imagen modificada de la división de las espermatogonias en el modelo murino, el número en corchetes indica el número de células hijas generadas en cada división. (Fuente: Ehmcke *et al.*, 2006)

El nicho de las SSC es un microambiente en donde estas células reciben las señales que regulan su autorrenovación, proliferación celular, mantenimiento de un estado de indiferenciación, quiescencia o apoptosis (Oatley y Brinster, 2012; Shams *et al.*, 2017). El nicho está conformado por: célula de soporte, células madre y la matriz extracelular (Fuchs *et al.*, 2004). Las células de soporte son las células de Sertoli que producen citoquinas y factores de crecimiento como el Factor de crecimiento de fibroblastos 2 o FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2 por sus siglas en inglés) que podría inducir la autorrenovación de las SSC (De Rooij, 2015), otro factor es el Factor neurotrófico derivado de células gliales o GDNF (Glial Cell-derived Neurotrophic Factor por sus siglas en inglés) necesario para mantener el proceso de espermatogénesis (Naughton *et al.*, 2006; Roser, 2008; De Rooij, 2017a; Hamidabadi y Bojnordi, 2017)). Otras células somáticas que influyen indirectamente en las SSC

son: las células de Leydig ubicadas en el espacio intersticial, producen testosterona (Zheng *et al.*, 2014) y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF1), este último actúa en el mantenimiento de las SSC; y las células mioideas peritubulares que producen el Factor estimulante de colonia (CSF1) y GDNF (Kubota y Brinster, 2018), además son las responsables de la contracción de los túbulos seminíferos para el transporte de los espermatozoides (Moreno, 2015).

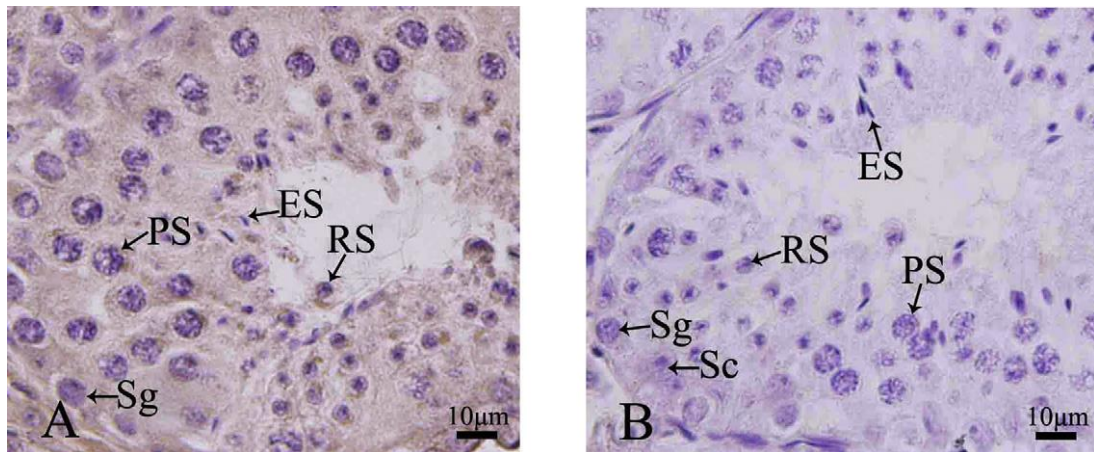


Figura 3. Nicho de las SSC en el testículo de alpaca. Sc: Células de Sertoli, Sg: espermatogonia, PS: espermatocono paquiténico, RS: espermátidas redondas, ES: espermátida elongada. (Fuente Guo *et al.*, 2013)

En el caso de la alpaca (Fig.3), estudios a nivel testicular muestran la disposición de las SSC encontrándose que en machos de un año de edad (prepúberes) el espacio intersticial es mucho mayor (células de Leydig prominentes) y el lumen de los túbulos seminíferos aún no es pronunciado con presencia de espermatogonias rodeadas por células de Sertoli inmaduras, mientras que en el caso de machos de dos años de edad se observa una morfología distinta en la que el lumen de los túbulos seminíferos es más pronunciado debido a la presencia de espermatozoides, las espermatogonias se encuentra en el compartimento basal y en contacto directo con las células de Sertoli, los espermatozoides y espermátidas se encuentran cerca a la luz de túbulo; el espacio intersticial se ve mayormente reducido (He *et al.*, 2009). Esto también se

ha encontrado al comparar histológicamente los testículos de cerdo de 5 días con los de 6 meses (Lee W. Y. *et al.*, 2013).

Se ha visto que el tamaño de los testículos de alpaca está relacionado a la producción de espermatozoides por lo que esta variable puede ayudarnos a estimar la concentración de espermatozoides producidos por un macho fértil (Galloway, 2000). Sin embargo, la producción de espermatozoides en relación a los tipos de células presentes en el túbulo seminífero aún falta ser estudiada (Tibary y Vaughan, 2006).

2.4.1 Caracterización de SSC

El empleo de marcadores moleculares específicos de estas células es necesario para aislarlas y purificarlas, además que permiten hacer un seguimiento de estas células durante el cultivo para evaluar si mantienen sus características como la autorrenovación (Ryu *et al.*, 2004; Takashima y Shinohara, 2018). Según su expresión, algunos marcadores se encuentran en la membrana celular de las SSC como Integrina $\beta 1$ o el receptor para GDNF (GRFA1), también a nivel citoplásmico como PLZF (Shinohara *et al.*, 1999; Aponte, 2015; Vansandt *et al.*, 2016). Se han evaluado genes relacionados a la pluripotencia como Oct4, Nanog o aquellos relacionados a espermatogonias indiferenciadas como PLZF o PGP 9.5 (Lee W. Y. *et al.*, 2013) Las SSC no expresan c-Kit ya que este marcador es utilizado para células diferenciadas a partir de espermatogonias tipo A (Ohta, 2000; Izadyar *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha observado que los marcadores pueden variar entre especies, en humano se suele utilizar PLZF, PGP 9.5, THY1 (Guo *et al.*, 2013) y potenciales marcadores como FGFR3, SALL4 (Eildermann *et al.*, 2012; Von Kopylow *et al.*, 2012). El marcador PGP 9.5, también conocida como UCHL1, OCT 4, NANOG y THY1 se han visto expresados en cerdos (Luo *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2014), mientras que PLZF y THY1 muestra expresión conservada en bovino y cabra (González *et al.*, 2017) y en el caso de murinos que han sido ampliamente estudiados en este campo se usa GFRA1, ITGA6 y THY1 (He *et al.*, 2007).

Recientemente se ha encontrado un factor de transcripción PAX7, empleado para espermatogonias tipo As en ratones (Aloisio *et al.*, 2004).

Se ha demostrado el empleo de lectinas como el DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin) ya que se une a las SSC por medio de glicoproteínas presentes en la membrana de la célula (Herrid *et al.*, 2007). Sin embargo, las SSC actualmente aún no se encuentran bien caracterizadas por la escasez de marcadores moleculares específicos que las diferencien de otras células germinales (Costa, 2012; Bellaiche, 2014), morfológicamente las SSC son iguales a las primeras generaciones de sus células hijas (Aponte y De Rooij, 2008).

2.4.2 Conservación De Fertilidad y SSC

El valor potencial de las células madres espermatogoniales se ve plasmado en su utilización para trasplantes (xenotrasplante u alotrasplante) a machos infértiles, ya que pueden llevar a cabo la espermatogénesis y producir espermatozoides que puedan transmitir el genotipo del donador a la progenie (Dobrinski, 2006; Park *et al.*, 2014). Además, diversos estudios en murinos, porcinos, bovinos, etc. han mostrado que el aislamiento, enriquecimiento y posterior cultivo *In vitro* de las SSC aumenta la posibilidad de conservar y restaurar la fertilidad masculina (Lee W. Y. *et al.* 2013; Mirzapour *et al.* 2013; Kim *et al.*, 2014), pudiendo lograr una diferenciación *In vitro* de estas células (Oatley *et al.*, 2014; Aponte, 2015). Es por eso su aplicación biotecnológica como trasplante luego de un tratamiento gonadotóxico como quimioterapias que permita restablecer la fertilidad del receptor (Galuppo, 2015). En murinos ya se ha aplicado esta técnica con eficiencia llegando a obtener descendencia a partir de las SSC trasplantadas (Kanatatsu-Shinohara *et al.*, 2003).

La técnica de criopreservación también es empleada para poder conservar el material genético que alberga las SSC, estas pueden ser criopreservadas de manera aislada o en biopsias testiculares (Valdivia, 2019) y se ha visto que las

SSC pueden ser criogenerpreservadas luego de su proliferación *In vitro*, para aumentar el porcentaje de SSC, manteniendo así su potencial de generar gametos y su calidad celular postdescongelamiento (Vásquez, 2018). Es por eso que en los últimos años se han desarrollado diversos métodos de aislamiento y cultivo de células madre espermatogoniales en diversas especies de mamíferos como primates, ratones y alpaca (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008; Mohaqiq *et al.*, 2013; Valdivia *et al.*, 2019b), para la conservación de líneas germinales y producción de transgénicos (Kim *et. al.*, 2015; Gonzáles *et al.*, 2017).

2.4.3 Cultivo de SSC

Debido al potencial empleo de las células madre espermatogoniales y su baja proporción con respecto a otras células testiculares en individuos adultos, es que el cultivo *In vitro* de SSC ha tomado mucha importancia con el propósito de proliferar, caracterizar, mantener y diferenciar *In vitro* (Aponte *et al.*, 2008; Mulder, 2016). Con este fin las células madre deben ser aisladas a partir de biopsias testiculares, para lo cual se emplea la técnica de digestión enzimática (Izadyar *et al.*, 2002; Koruji *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2015). Las enzimas mayormente utilizadas son: tripsina que remueve el tejido intersticial, espermatozoides y espermátidas (Mohamadi *et al.*, 2012); colagenasa que rompe el colágeno presente en la membrana basal; hialuronidasa que actúa sobre la matriz extracelular del tejido conectivo; y DNAsa que degrada el material genético de células dañadas y reduce la viscosidad de la suspensión celular obtenida (Izadyar *et al.*, 2002). Los medios más utilizados para el aislamiento son DMEM o DMEM-F12, suplementados con antibióticos.

Desde que se reportaron los primeros estudios sobre el cultivo de células madre espermatogoniales (Bellve *et al.*, 1977; De Rooij y Russell, 2000; Nagano *et al.*, 1998) se han empleado diversas técnicas para inducir la proliferación y colonización de SSC como el empleo de energía acústica durante el cultivo *In vitro*

(Mohaqqi *et al.*, 2013), suplementar los medios de cultivo con factores de crecimiento, el utilizar medios libres de suero, comparar distintas temperaturas de incubación (Brinster, 2002; Aponte, 2009; Yan *et al.*, 2009; Lee W. Y. *et al.*, 2013). Los cultivos cortos son más fáciles de llevarlos a cabo, estos duran hasta los 7 días y se hacen monitoreos cada 3 días, mientras que los cultivos de largo plazo han tenido éxito solo en murinos (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2005), por lo que aún no están bien establecidos para otras especies (Akhondi *et al.*, 2013; Valdivia *et al.*, 2019b), estos suelen realizarse entre 1 a 6 meses.

Durante el cultivo *In vitro* de las SSC es necesario mantener un nivel apropiado de especies reactivas de oxígeno o ROS por sus siglas en inglés (Reactive Oxygen Species), que se generan producto del metabolismo de las propias células (proliferación, diferenciación, etc.), esto genera un nivel de estrés oxidativo mayor al generado *In vivo* (Wang *et al.*, 2014). Los niveles de ROS conllevan a un mal funcionamiento de las organelas, daño celular, daño en la membrana y apoptosis (Kushki *et al.*, 2015). Es por esto que se ha suplementado los medios de cultivo con una cantidad de vitamina C y E para mejorar la eficiencia de las SSC, ya que la presencia de antioxidantes ayudaría a mantener los niveles de ROS bajos y se protegería a las células activando vías antiapoptóticas (Moreira *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2012; Aliakbari *et al.*, 2016; Jafarnejad, *et al.*, 2018).

Debido a la importancia de las células de Sertoli es que muchos sistemas de cultivo implementan la utilización de estas células como una monocapa de alimentación para las SSC (co-cultivos) y puedan así mantener su capacidad proliferativa (Anjamrooz *et al.*, 2006; Mohamadi *et al.*, 2012). Estas células tienen márgenes irregulares y una apariencia granular. Uno de los factores secretados por células de Sertoli es el GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor), por eso la importancia de este factor en el cultivo ya que permite el mantenimiento y proliferación en las colonias. Sin embargo, otros estudios muestran que si bien incrementa las tasas de supervivencia no es considerable el mantenimiento de la

proliferación (Nagano *et al.*, 1998; Mohamadi *et al.*, 2012), por lo que otras técnicas son necesarias para soportar esta proliferación.

Las condiciones de cultivo comúnmente empleadas consideran una temperatura de 37°C y 5% de CO₂ (para mantener el pH, por medio del sistema de buffer compuesto por CO₂-HCO₃), aunque estos parámetros dependen mucho del tipo de células con el cual se va a trabajar. Los medios de cultivo utilizados son DMEM o DMEM/F12 (humanos, murinos y bovinos) y STEMPRO (humano), estos deben ser suplementados con nutrientes necesarios para el mantenimiento de la SSC, como: SFB, es fuente de factores de adhesión y factores de crecimiento como GDNF, FGF y EGF (Bedford-Guaus *et al.*, 2017), hormonas, lípidos y minerales; Glucosa y piruvato, fuentes de energía (Lee Y. *et al.*, 2013); Aminoácidos, precursores de proteínas; Vitaminas; como cofactores; Sales inorgánicas, mantenimiento de la ósmosis; Antibióticos, para evitar el crecimiento de contaminantes (Gat *et al.*, 2017).

Sin embargo, aún no existe un sistema de cultivo ideal que pueda soportar la expansión y el mantenimiento de las SSC (Wang *et al.*, 2014), por lo que la búsqueda de distintas técnicas y mejoras en el cultivo *In vitro* son necesarias (Aponte y De Rooij, 2008).

2.5 Métodos de Enriquecimiento de fracciones celulares

Como se mencionó anteriormente el número de SSC en el testículo es muy bajo comparado a otras células testiculares, por lo que el enriquecimiento y purificación de estas células es muy importante. Para lo cual se debe de tener en cuenta las características de la célula que se quiere purificar, tamaño, densidad, capacidad de adhesión y marcadores de superficie (Zhang *et al.*, 2016). Luego de obtener las células testiculares aisladas se emplean métodos de filtración como mallas de nylon para eliminar células somáticas (células mioides y de Sertoli, Park *et al.*, 2014) y para obtener una suspensión con un mayor porcentaje de SSC se emplean diversos

métodos como gradientes de densidad (Goel *et al.*, 2007), plaqueo diferencial (Heidari *et al.*, 2014) o el enriquecimiento mediante técnicas como MACS (Magnetic-activated cell sorting) y FACS (fluorescence-activated cell sorting), esta última es empleada con un marcador de SSC y citometría de flujo (Zhang *et al.*, 2016).

Otro método para purificar SSC es la utilización de la lectina PNA (Peanut agglutinin) para separar espermatoцитos de espermatoгонias tipo A, obteniéndose fracciones con mayor porcentaje como 30 a 45% (Van Pelt *et al.*, 1996; Mohamadi *et al.*, 2012). Sin embargo, estos métodos no son totalmente efectivos ya que no se logra obtener una pureza del 100%. Todas las técnicas mencionadas presentan ventajas y desventajas por lo que el empleo combinado de estas técnicas mejora la eficiencia de la purificación, pudiendo obtener más del 60% de espermatoгонias tipo A (Izadyar *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2006). Además, se debe realizar un monitoreo de los cultivos para evaluar la presencia de células somáticas (Langenstroth *et al.*, 2014).

2.5.1 Gradientes de densidad de Percoll

La separación por gradientes de densidad se basa en las distintas densidades de células en una muestra heterogénea, la muestra es colocada encima de las gradientes y en la centrifugación cada tipo de célula se ubicará donde su densidad celular sea igual a la densidad del medio de gradiente (punto isopícnico), por lo que se basa en el tamaño y peso de las células, una vez alcanzado este equilibrio la migración de la célula no se ve afectada por el tiempo ni la fuerza de centrifugación (Rickwood, 1978). Este método de separación de células no es costoso sin embargo presenta una baja especificidad y baja pureza a diferencia de MACS y FACS, además de necesitar mucho cuidado para realizarlo. Existen distintos medios de densidad de gradientes Ficoll – Paque, Percoll, etc.

El Percoll está compuesto de partículas de sílice coloidales y polivinilpirrolidona (PVP), estas se encuentran solubles en agua ofreciendo una baja viscosidad a la solución además de no ser tóxica. El Percoll tiene una densidad de 1.131 g/mL y

es ampliamente usado para separar células, organelas, virus y subpartículas celulares (Laurent *et al.*, 1980). La osmolalidad de esta sustancia es muy baja y permite formar gradientes de densidad a partir de esta sin variar demasiado esta propiedad, lo cual es necesario para poder mantener la viabilidad de las células y su morfología intacta (Pertoft *et al.*, 1977).

Para la preparación de los gradientes de densidad primero se debe de ajustar la osmolalidad del Percoll para lo cual se prepara un stock con soluciones salinas (10X), y posteriormente se diluye a las densidades deseadas con solución salina (1X) y se preparan los gradientes de densidad como se describe en

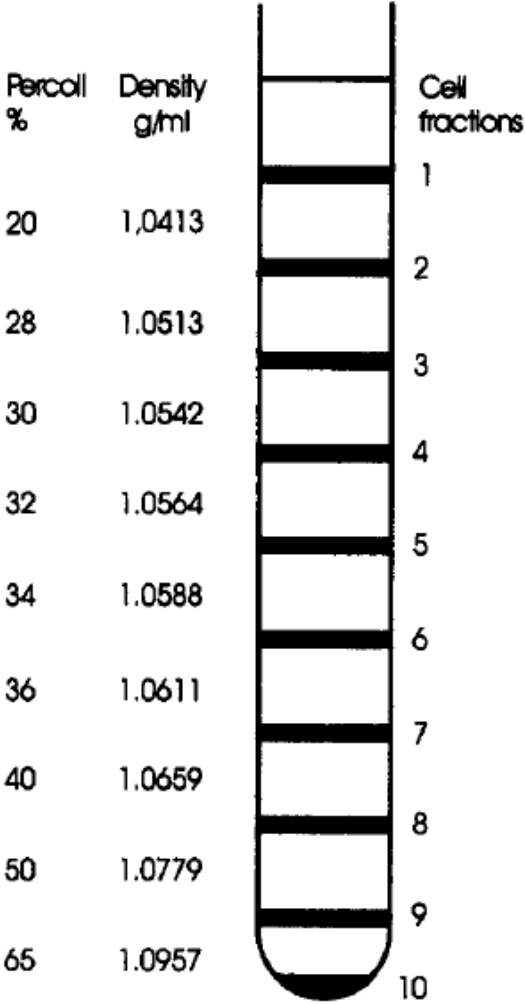


Figura 4. Representación esquemática de los gradientes discontinuos de Percoll (Fuente: Van Pelt *et al.*,1996)

el Manual del Percoll, estas gradientes son colocadas en un tubo cuidadosamente para no mezclar las fases (Fig.4), desde la gradiente de mayor densidad hasta la de menor densidad (Manual de Percoll, 2001; Hrubec *et al.*, 1985).

La baja viscosidad y la osmolalidad del Percoll permiten la separación de varios tipos celulares (Heidari *et al.*, 2014). Por lo que es ampliamente utilizado para la purificación de espermatogonias de ratón, cerdo, bovino (Van Pelt *et al.*, 1996; Marret & Durand, 2000; Izadyar *et al.*, 2002) y con menor frecuencia en oveja y pollo

(Rodríguez-Sosa *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009). Las gradientes de densidad ampliamente usadas van desde el 20% al 65% (Kim *et al.*, 2014; Kitamura *et al.*, 2018b). Se ha logrado obtener espermatogonias tipo A con una pureza de más del 50% (Bucci *et al.*, 1986; Izadyar *et al.*, 2002), sin embargo, debido a que el tamaño de las espermatogonias es similar, con este método se pueden obtener todas las espermatogonias tipo A y no solamente las SSC (Zhang *et al.*, 2016).

2.6 Matrices Extracelulares

La Matriz Extracelular (MEC) es una red tridimensional que brinda soporte a las células que la rodean tanto estructural como bioquímicamente. En esta se encuentran macromoléculas como colágeno, enzimas, y muchas glicoproteínas. La MEC por su composición posee funciones como la adhesión celular, comunicación célula-célula, la diferenciación celular, crecimiento, expresión génica, migración y regeneración de tejidos, por medio de los receptores celulares de superficie que traducen las señales de la MEC a las células (Theocharis *et al.*, 2016). Un cambio en la composición de la MEC puede estar relacionada a diversas condiciones patológicas. La unión a la MEC está dada por integrinas y otras moléculas, además esta estructura es altamente dinámica y remodelada constantemente; estas características brindan las diversas propiedades a los distintos órganos como elasticidad, tensión y fuerza (Frantz *et al.*, 2010). Los estudios sobre la MEC tratan de explicar la influencia de esta en la respuesta y la actividad celular, así como la importancia de las células en el mantenimiento de la MEC (Kular *et al.*, 2014).

La MEC es muy importante para la regulación de las células madre en varios tejidos (Watt *et al.*, 2013), por ejemplo, los túbulos seminíferos se encuentran rodeados de moléculas de matriz extracelular (Glattauer *et al.*, 2007), por lo que las SSC se encuentran en contacto directo con componentes de la matriz como el colágeno, la laminina y la fibronectina (Glattauer *et al.*, 2007; Riboldi, 2013). Esta interacción se da por medios de las integrinas de la superficie de las SSC que median interacciones

célula-célula e interacciones células - MEC (Park *et al.*, 2018). Además, el proceso de diferenciación genera cambios en la expresión de las moléculas de adhesión de las SSC (Carlomagno *et al.*, 2010), motivo por el cual estas moléculas también se han utilizado para identificar y purificar células germinales en una suspensión de células testiculares (Hamra *et al.*, 2005), aunque no se ha tenido mucho éxito en otros estudios (Kim *et al.*, 2014).

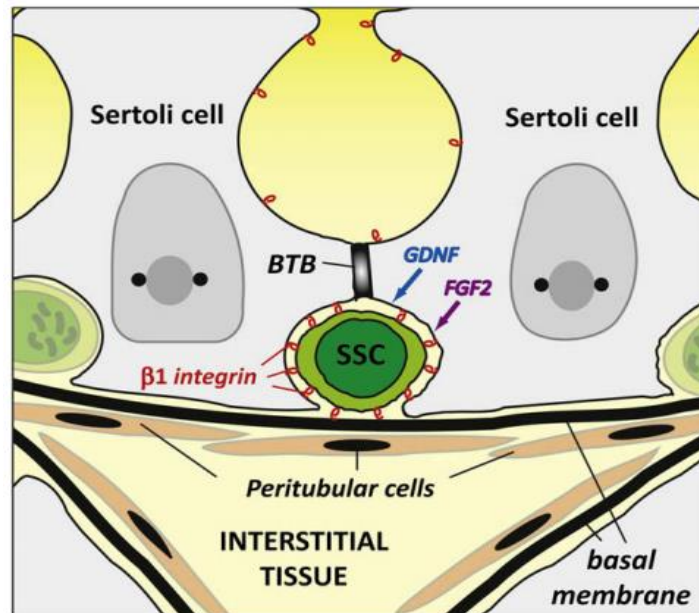


Figura 5. Interacción entre las células madre espermatogoniales y la matriz extracelular del túbulo seminífero. (Fuente: De Rooij *et al.*, 2008)

Para poder cultivar un tipo celular, las células deben de ser aisladas y en este proceso se pierde la interacción entre las células y la matriz extracelular del tejido donde se encontraban, por lo que estudios han venido implementando la técnica de matrices tridimensionales en el cultivo *In vitro*. En el caso de cultivos *In vitro* de células óseas en matrices se forman adhesiones, estas estructuras difieren un poco en composición, forma, distribución y actividad con respecto a las adhesiones observadas en células que crecen sin matriz. Al usar estas matrices en los cultivos se observa una mayor adhesión, velocidad de proliferación celular y morfología similar a las células *In vivo*. Por lo que el cultivo con matrices extracelulares es una

alternativa a otros cultivos que implementan células alimentadoras para poder soportar la proliferación de SSC (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2005). En el caso de las células germinales su estado pluripotencial puede ser soportada por el empleo de componentes de la MEC, ya que interactúan con las moléculas de adhesión de la superficie celular (Chai y Leong, 2007). El cultivo de SSC con distintos tipos de matrices extracelulares es un tipo de cultivo celular en tres dimensiones que incentivan la interacción célula-MEC y célula-célula, lo que se asemeja más a un sistema *In vivo*, esto promueve la secreción paracrina de citoquinas entre estas y una mayor supervivencia celular (Xu *et al.*, 2016).

Entre las moléculas de la MEC que se utilizan tenemos la laminina que es una importante glicoproteína presente en la membrana de los gonocitos y relacionada a la adhesión de células de Sertoli (El Ouali *et al.*, 1991). Otra molécula empleada como parte de la matriz extracelular es la gelatina, forma desnaturalizada del colágeno, presenta características similares a este, pero mayor hidrosolubilidad y menor costo.

2.7 Lectina *Dolichos biflorus* aglutinina (DBA)

Las lectinas permiten la identificación *in situ* de las glicomoléculas presentes en la superficie celular, ya que son proteínas con la propiedad de residuos de carbohidratos que se encuentren libres o unidos a una molécula más compleja (Madrid *et al.*, 2000), por lo que permiten el aislamiento y caracterización en base a estos epítomos. La reacción de los epítomos de la superficie celular con las lectinas permite mostrar cambios en células embrionarias que indicarían algún aspecto funcional (Nash *et al.*, 2007).

Dolichos biflorus aglutinina (DBA) es una glicoproteína de 4 subunidades, esta lectina es usada como marcador de células germinales, como lo son las espermatogonias tipo A en cerdo, bovino e incluso alpaca (Goel *et al.*, 2007; Izadyar *et al.*, 2002; Valdivia *et al.*, 2019a), ya que reconoce un residuo terminal α -N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Piller *et al.*, 1990), un epítomo de la superficie celular de las células madre. Se ha

validado el uso de esta lectina en el reconocimiento de espermatogonias tipo A, al corroborarse con ensayos de inmunohistoquímica por medio de marcadores moleculares como NANOG, PLZF, PGP 9.5 e ITGB1 (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2011; Lee W. Y. *et al.*, 2013), contrastarlo con características morfológicas y por su posición en el túbulo seminífero (Herrid *et al.*, 2007). Esta lectina ha mostrado una fuerte afinidad a las SSC de toros y gatos domésticos (Herrid *et al.*, 2007; Escala-Rebelo *et al.*, 2016). Es por eso su empleo en técnicas de enriquecimiento de esta población celular como FACS (Herrid *et al.*, 2009).

Una célula madre al iniciar el proceso de diferenciación va perdiendo los epítomos glucanos presentes en su membrana celular, incluyendo los residuos de GalNAc, por ende, se va perdiendo reactividad con el DBA, esto se observó al comparar las células madre embrionarias y células del ectodermo (estas últimas en estado de diferenciación temprana) obteniendo que el DBA fue la única lectina capaz de diferenciarlos (Nash *et al.*, 2007). En las espermatogonias tipo A de toro también se ha encontrado dos poblaciones celulares discriminadas por la intensidad de fluorescencia con el DBA (Izadyar *et al.*, 2002) al igual que en alpaca. Por lo que esta lectina es un indicador de pluripotencia y diferenciación temprana de la célula madre espermatogonial (Valdivia *et al.*, 2019a).

Debido a este reconocimiento entre la lectina y su ligando presente en la superficie de las células, el DBA junto a otras lectinas ha sido usado como suplemento en el cultivo *In vitro* de células mesenquimales y evaluar su influencia en las células (Talaie-Khozani *et al.*, 2011), por lo que esta metodología puede ser un modelo para entender el rol de las moléculas de glucanos en la superficie de las SSC tanto en la adhesión como en la proliferación de espermatogonias *In vivo* e *In vitro* (Kim *et al.*, 2014).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

- El crecimiento y proliferación in vitro de células madre espermatogoniales de *Vicugna pacos* se optimizan cuando se cultivan con lectina aislada de semillas de *Dolichos biflorus*.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

- Cultivar y proliferar células madre espermatogoniales de *Vicugna pacos* purificadas por medio de la utilización de matrices extracelulares adherentes.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Aislar las células testiculares mediante procesos enzimáticos
- Purificar la fracción de células madre espermatogoniales (SSC)
- Cultivar las SSC in vitro
- Determinar el porcentaje de SSC obtenido por la adherencia a las matrices extracelulares

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material Biológico

Las muestras biológicas trabajadas en esta investigación provinieron de alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Huancavelica, localizado a más de 3500 msnm en el centro poblado Callqui Chico (Anexo N° 1), la población de alpacas que llega a este lugar suelen ser machos adultos. Los testículos obtenidos fueron lavados con suero fisiológico más antibióticos (penicilina 100 µg/ml y estreptomycinina 100 µg/ml) y colocados en cajas termoaislantes a 4°C con ayuda de gelpacks para ser transportados al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas (UNMSM) a donde llegan 24 horas después del sacrificio del animal. Se procesaron 12 pares de testículos de alpaca para este estudio.

4.1.2 Medios de cultivo y reactivos

4.1.2.1 Medio de lavado de muestras biológicas

Buffer Dulbecco (DPBS): 9.6 g/L de Dulbecco's Buffer Fosfato Salino (Sigma-Aldrich, D5773), 0.1 g/L de Cloruro de calcio (Sigma-Aldrich, C1016), 0.075 g/L de Penicilina (Sigma-Aldrich, P3032), 0.075 g/L de Estreptomycinina (Sigma-Aldrich, S9137) y 2 mL de Heparina Sódica.

4.1.2.2 Medio de aislamiento de espermatozoides

Medio HAM F-10: 9.8 g/L del Mix de nutrientes HAM F-10 (Sigma-Aldrich, N6635), 2.1 g de bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, S5761), 0.245 g de Lactato de Calcio (Sigma-Aldrich, L4388), 0.075 g/L de Penicilina, 0.075 g/L de Estreptomycinina y suplementado con BSA al 0.4% (Sigma-Aldrich, A3311).

4.1.2.3 Medio de aislamiento de células espermatozonales

Medio de aislamiento celular: Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich, M4655) suplementado con 4mg/mL de BSA, 100µg/mL de Penicilina (Sigma-Aldrich, P3032) y 100µg/mL de Estreptomicina (Sigma-Aldrich, S9137).

Medio para digestión enzimática de tejido testicular

- Digestión enzimática 1: Medio de aislamiento celular suplementado con 0.5 mg/ml de Hialuronidasa Tipo I (Sigma-Aldrich, H3506), 1 mg/ml de Colagenasa Tipo V (Sigma-Aldrich, C9263) y 2.6 µL/mL DNAasa I Tipo II (Sigma-Aldrich, D4527)
- Digestión enzimática 2: Medio de aislamiento celular suplementado con 0.5 mg/ml de Hialuronidasa Tipo I (Sigma-Aldrich, H3506) y 1 mg/ml de Colagenasa Tipo V (Sigma-Aldrich, C9263).

4.1.2.4 Medio de cultivo celular

Medio DMEM suplementado: Dulbecco's Modified Eagle Medium [1X] (Sigma-Aldrich, D5796) con glucosa, 0.29 mg/mL de L-glutamina (Sigma-Aldrich, G8540), 10 µL/mL de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich, M7145), 10 µL/mL de insulina-transferrina (Sigma-Aldrich, I1884), 30 mg/mL de ácido pirúvico (Sigma-Aldrich, P5280), 1 µL/mL de ácido láctico (Sigma-Aldrich, L1375), 1% de SFB (Sigma-Aldrich, F4135), 10 µg/mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich, G1264) 100 µg/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Estreptomicina, 0.5% de BSA y 1% de suero de leche materna.

Todos los medios (lavado, aislamiento y cultivo) fueron filtrados mediante el empleo de filtros de membrana de 0.22 µm (Millex – GV Merck).

4.1.2.5 Reactivos para concentración y viabilidad celular

PBS: 8g/L de Cloruro de Sodio (Sigma-Aldrich, S5886), 0.2 g/L de Cloruro de Potasio (Sigma-Aldrich, P9333), 0.24 g/L de Fosfato de Potasio (Sigma-Aldrich, P5379) y 1.62 g/L de Fosfato dibásico de Sodio (Sigma-Aldrich, S5136) a pH 7.4, suplementado con 0.075 g/L de Penicilina y Estreptomicina.

Azul de Tripán: Azul de tripán (Sigma-Aldrich, T6146) al 0.04% en PBS.

4.1.2.6 Reactivos para purificación de células

Solución de ajuste de osmolalidad del Percoll (Percoll 100%): Percoll® (Sigma-Aldrich, E0414) disuelto en 1,5 M de Cloruro de Sodio más 0.024 g/mL de HEPES (Sigma-Aldrich, H4034) en la proporción de 9:1, más antibióticos.

Solución para la dilución de las gradientes de Percoll: 0.15 M de Cloruro de Sodio más 0.0024 g/mL de HEPES, más antibióticos

4.1.2.7 Reactivos para la preparación de matrices extracelulares y DBA

Gelatina al 0.2%: 2mg/mL de Gelatina Tipo B de Bovino (Sigma-Aldrich, G9391) en agua ultrapura.

DBA: DBA (Vector Laboratories, L-1030) disuelto en 100 mM de Buffer HEPES salino y 150 mM de Cloruro de Sodio.

4.1.2.8 Reactivos para la fijación de células

PBS suplementado con BSA al 0.1%

Metanol (Merck) al 80% en PBS con BSA al 0.1%

4.1.2.9 Reactivos para la evaluación de poblaciones celulares por CF y MF

DBA-FITC (EY Laboratories, F-1201-5)

Buffer Dulbecco suplementado con BSA al 0.4%

4.1.3 Materiales de plástico, metal y vidrio.

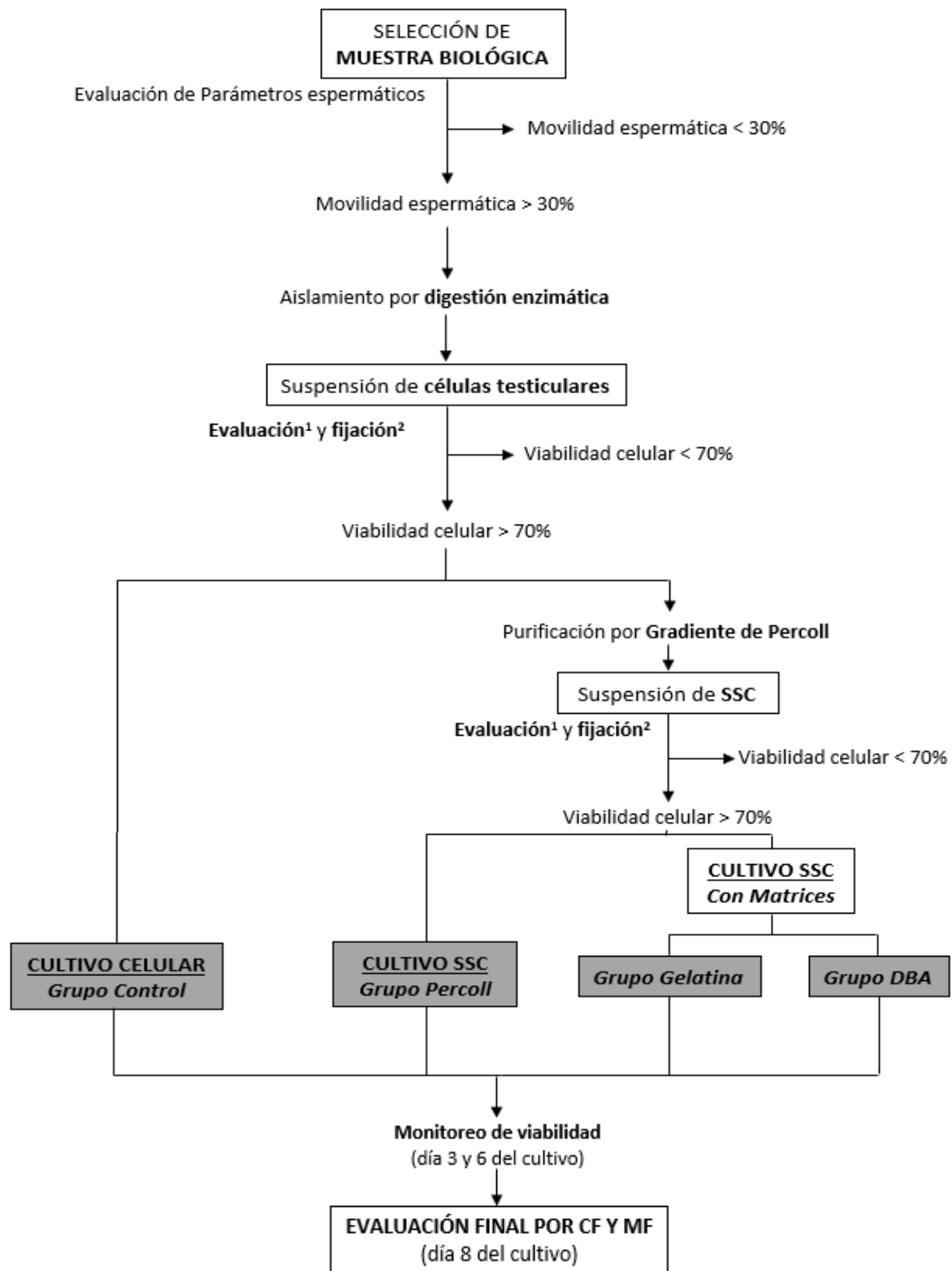
Placas de Petri, puntas para micropipeta, tubos de centrífuga de 1.5, 0.6 y 0.2mL, tubos Falcon de 15mL y 50mL, filtros de membrana de 0.22 μ m (Merck), placas de cultivo de 12 pocillos (SPL Life Science), tijeras, coladores, pinzas, frascos de vidrio, jeringas de 10mL y 20 mL, Cámara de Neubauer (Boecco), guantes de nitrilo, laminas y laminillas

4.1.4 Equipos de laboratorio

Incubadora de CO² Thermo Scientific, Cabina de flujo laminar Labconco, Centrífuga Eppendorf 5424R, Rotador de tubos RS-24 Biosan, Citómetro de Flujo AMNIS, Microscopio de Fluorescencia AJ43 Seitz, Microscopio Óptico, Microscopio invertido, Micropipetas Eppendorf, Balanza analítica, Plancha termocontrolada, Autoclave, sistema de purificación de agua y refrigeradores.

4.2 Metodología

Se resumen la metodología realizada en este trabajo de investigación en el flujograma presentado (Figura 6), y se procede a explicar cada uno de los protocolos realizados en este estudio.



¹viabilidad celular y concentración celular

² para su posterior evaluación por Citometría de Flujo (CF) y Microscopía de Fluorescencia (MF).

Figura 6. Flujograma de trabajo realizado por cada muestra evaluada

4.2.1 Evaluación de parámetros espermáticos de las muestras biológicas

Se procesaron 12 muestras biológicas de alpaca "*Vicugna Pacos*" provenientes del Camal Municipal de Huancavelica (24 horas post mortem), se procedió a extraer el epidídimo de cada testículo y liberar los espermatozoides en medio HAM F-10 para la evaluación de parámetros espermáticos como concentración espermática, viabilidad y movilidad espermáticas, además del peso promedio testicular. Los parámetros espermáticos fueron evaluados según el Manual de evaluación de Semen Humano de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010). Se seleccionaron aquellos testículos con peso mayor a 8 gramos.

4.2.2 Aislamiento de Células Madre Spermatogoniales (SSC)

Los testículos seleccionados fueron lavados con Buffer Dulbecco y antibióticos antes de ser procesados en la Cabina de flujo laminar para mantener la esterilidad. Los materiales de metal empleados fueron previamente autoclavados a 121°C y cada muestra fue procesada independientemente. Los testículos previamente lavados fueron decapsulados y liberados de su túnica albugínea, con ayuda de tijeras y pinzas se obtuvieron 3 trozos de tejido de 1gr cada uno que fueron triturados y filtrados a través de una malla de metal para ser resuspendidos en el medio de aislamiento (MEM con estreptomicina y penicilina), se obtuvieron 3 ml de suspensión celular por muestra. Las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 37°C, 1500 rpm por 5 minutos, estas condiciones se mantuvieron a lo largo de todo el proceso, se realizaron dos lavados posteriores.

Después de los lavados, se procedió con las digestiones enzimáticas, la primera digestión fue realizada con las enzimas colagenasa, hialuronidasa y DNAasa por 30 minutos a 37°C con agitación constante en la incubadora de CO². La segunda digestión (sin enzima DNAsa) se realizó por 20 minutos en las mismas condiciones, después de cada proceso enzimático se realizaron dos lavados. Por

último, se resuspendieron las muestras en 1 mL de medio de aislamiento cada una (Anexo N°3).

4.2.3 Evaluación de viabilidad y concentración celular

Para evaluar la concentración celular se agregó 10 μ L de cada muestra en 990 μ L de PBS, se colocó 10 μ L de esta mezcla en una Cámara de Neubauer y se realizó el conteo con ayuda del microscopio. La viabilidad celular fue evaluada con azul de Tripán, para lo cual se mezcló 10 μ L de cada muestra con 2 μ L de Tripán en una lámina y se cubrió con una laminilla para observarla al microscopio, en todo momento se mantuvo la temperatura de 37°C. Determinada la concentración celular se separó un millón de células de cada muestra para el procedimiento de fijación (4.2.4), purificación con Percoll y el resto de cada muestra fue cultivada (Grupo Control).

4.2.4 Fijación de células

Para la fijación las células fueron centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos a 37°C y posteriormente se hicieron dos lavados con 500 μ L de PBS suplementado con 0.1% de BSA. El pellet obtenido fue resuspendido en 500 μ L de Metanol al 80% e incubado por 20 minutos a -20°C, luego de la incubación se realizaron tres lavados a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C y finalmente fueron rotuladas y almacenadas a 4°C, para posteriormente evaluar el porcentaje de células madres espermatozonales por Microscopía de Fluorescencia o Citometría de Flujo.

4.2.5 Purificación de células espermatozonales aisladas por gradientes de Percoll

La suspensión de células espermatozonales obtenida luego del aislamiento fue colocada en las columnas de Percoll. El Percoll fue previamente preparado con la solución de NaCl 1.5M para obtener el punto isoosmótico considerado como

Percoll 100%, de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Esta solución de Percoll 100% fue utilizada para preparar las gradientes de 20 %, 30% y 40% (300uL cada una) colocadas una encima de otra lentamente para evitar mezclar las fases, empezando de la más densa en tubos de centrifuga de 1.5 mililitros. Los volúmenes empleados para la preparación de gradientes se detallan en la Tabla 1, con lo cual se consigue preparar seis columnas de gradientes de Percoll.

Tabla 1. Volúmenes de los reactivos para la preparación de las gradientes de Percoll.

	<i>Percoll 100%</i>	<i>NaCl 0.15M</i>
<i>20% (3 mL)</i>	0.6 mL	2.4 mL
<i>30% (3 mL)</i>	0.9 mL	2,1 mL
<i>40% (3 mL)</i>	1.2 mL	1.8 mL

Se agregaron 10 – 15 millones de células por columna en un volumen máximo de 400 µL cuidadosamente, para no remover las gradientes, luego los tubos fueron centrifugados durante 30 minutos a 800G a temperatura ambiente. Posteriormente se recuperaron las células madre espermatozonales de la gradiente de 30% de Percoll y se procedió a realizar tres lavados con medio de aislamiento a 1500 rpm por 5 minutos, en cada lavado el pellet celular fue resuspendido en medio de aislamiento nuevo. Luego, en la suspensión de células madres espermatozonales se evaluó la concentración y viabilidad celular con Azul de Tripán, como se indicó anteriormente en 4.2.3. Finalmente se fijó un millón de células en Metanol de acuerdo al apartado 4.2.4, para evaluar el porcentaje de SSC por CF o por Inmunofluorescencia indirecta (MF), el resto de las suspensiones celulares fueron cultivadas a las que se denominó Grupo Percoll.

4.2.6 Preparación de las placas de cultivo con matriz extracelular y DBA

Las placas de cultivo fueron cubiertas previamente con una película de gelatina (Sigma-Aldrich, G9391) que es la forma desnaturalizada del colágeno, y el DBA no fluorescente (Vector Laboratories, L-1030). La concentración empleada de gelatina fue de 0.2% y de DBA 30 µg/mL. Se incubaron las placas por 12 horas con gelatina y DBA a 37°C, terminado el tiempo de incubación se procedió a lavar dos veces con PBS más BSA al 0.5%. Las placas previamente preparadas se dejaron en la incubadora para ser usadas en el cultivo.

4.2.7 Cultivo y proliferación de células madre espermato goniales *In vitro*

La fracción de células madre espermato goniales fueron cultivadas en placas cubiertas con gelatina (Grupo gelatina) o DBA (Grupo DBA). Todos los grupos de tratamiento (Tabla 2) fueron cultivados en medio DMEM suplementado con leche materna (1%) y SFB (1%), como se detalla en el apartado 4.1.2.4 a una concentración de 2 millones por pocillo en placas de 12 pocillos e incubadas con CO₂ (5%) a 37°C y 100% de humedad.

Tabla 2. Detalles de los grupos de tratamiento

<i>Tratamiento</i>	<i>Especificaciones del cultivo</i>
<i>Grupo Control</i>	Cultivo de suspensión de células testiculares aisladas (SSC y células somáticas).
<i>Grupo Percoll</i>	Cultivo de SSC purificadas mediante gradientes de densidad con Percoll.
<i>Grupo Gelatina</i>	Cultivo de SSC purificadas en placas cubiertas con Gelatina.
<i>Grupo DBA</i>	Cultivo de SSC purificadas en placas cubiertas con DBA.

La proliferación de las células madre espermátogoniales se estimuló mediante la suplementación del medio con suero de leche materna, y se realizó el monitoreo del cultivo durante 8 días tomando fotografías de los cultivos con un microscopio invertido, además de evaluar la viabilidad celular en los días 3 y 6 de cultivo. A los 8 días de cultivo se procedió a fijar las células cultivadas de los distintos tratamientos para su posterior evaluación con DBA-FITC en citometría de flujo o microscopia de fluorescencia para analizar el porcentaje de SSC postcultivo entre tratamientos (Anexo N°4).

4.2.8 Evaluación mediante Citometría de Flujo y Microscopia de Fluorescencia

El porcentaje de células madre espermátogoniales fue evaluado después de ocho días de cultivo con el conjugado de lectina- fluorocromo DBA-FITC (Isotiocianato de fluoresceína). Las muestras fueron lavadas dos veces con Buffer Dulbecco suplementado con BSA al 0.1% en un volumen de 200 μ L, posteriormente se agregó 1 μ L de DBA-FITC y se resuspendieron las células para luego ser incubadas por 15 minutos a 37°C y en completa oscuridad. Terminado el tiempo de incubación se procedió a lavar dos veces las muestras con el mismo buffer utilizado anteriormente para ser evaluados por microscopia de fluorescencia y citometría de flujo.

Por citometría de flujo se analizaron 10 mil células con un láser de 488 nm de longitud de onda para evaluar el FITC, se seleccionó el área donde se encuentran las células espermátogoniales redondas para el análisis con el citómetro de flujo (Figura 7), el DBA permitió discernir tres tipos de poblaciones celulares de acuerdo a Valdivia *et al.* (2019a), aquellas que presentaban una fuerte afinidad con el DBA son las strong DBA (sDBA+), aquellas que fueron perdiendo la afinidad con el DBA son las weak DBA (wDBA+) y por último se encuentran las DBA- que no tienen

ninguna afinidad con el DBA (Tabla 3), las cuales se diferenciaron por la intensidad de la fluorescencia (Figura 8).

Tabla 3. Tipos de poblaciones celulares utilizando DBA-FITC en Alpacas (*Vicugna pacos*)

<i>Etiqueta</i>	<i>Intensidad de fluorescencia</i>	<i>Poblaciones</i>
<i>sDBA+</i>	Fuerte	SSC
<i>wDBA+</i>	Débil	SSC en diferenciación temprana
<i>DBA-</i>	Ausente	Células diferenciadas

**De acuerdo a Valdivia et al., 2019.*

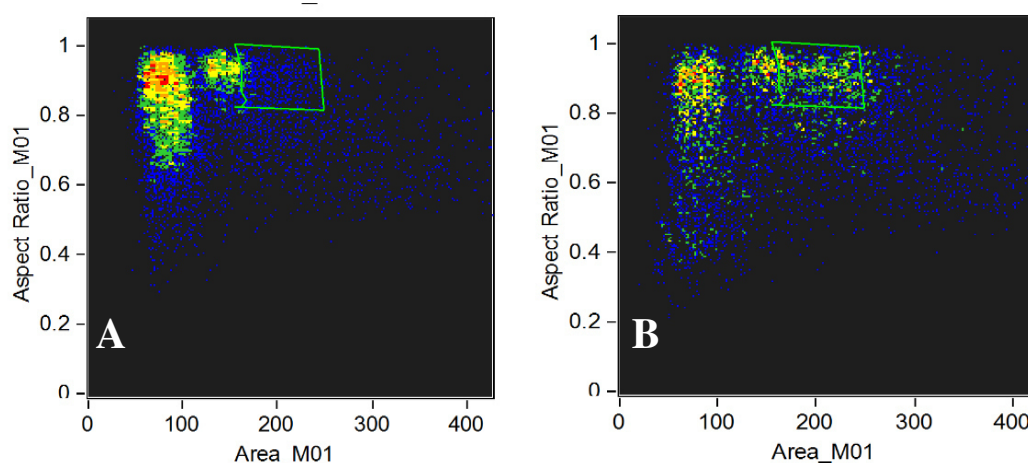


Figura 7. Ploteo de la población de células redondas (área verde) observadas por citometría de flujo. A. Muestra sin pasar por gradientes de Percoll, B. Muestra después de la purificación de Percoll

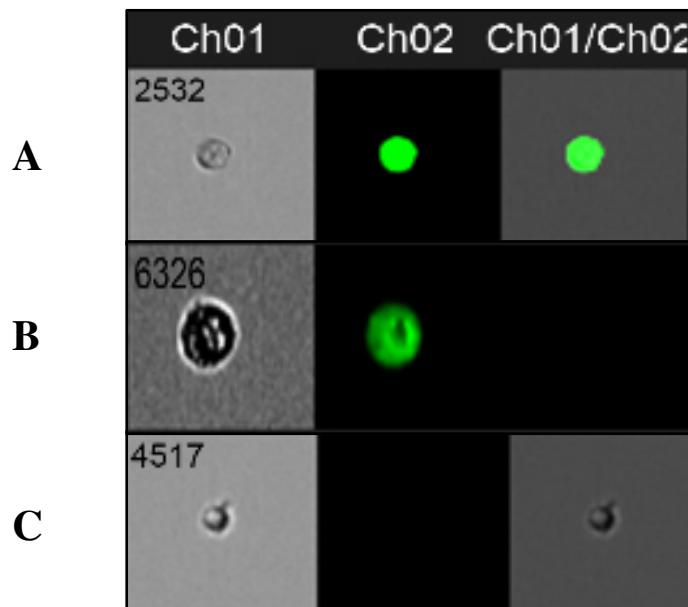


Figura 8. Imágenes de la fluorescencia de las tres poblaciones celulares diferenciadas por DBA-FITC por Citometría de Flujo. A. strong DBA positivas, B. weak DBA positivas, C. DBA negativas.

Para la evaluación por Microscopia de fluorescencia las muestras tratadas previamente con DBA-FITC fueron colocadas en láminas y observadas en total oscuridad, se contaron aproximadamente 300 células por muestra. También se diferenciaron las tres poblaciones ya mencionadas (Figura 9).

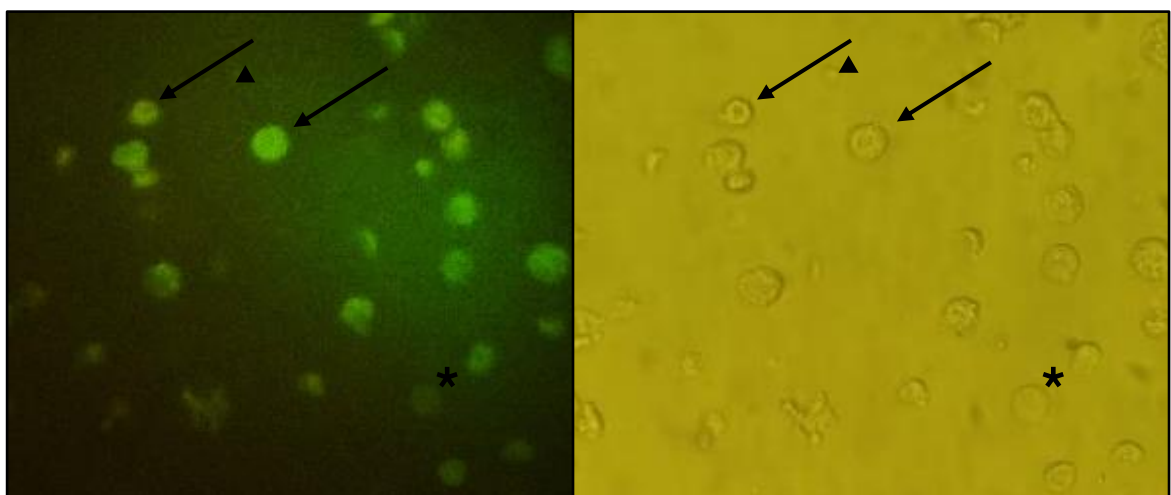


Figura 9. Evaluación por Microscopia de Fluorescencia. Células strong DBA positivas (flechas), weak DBA positivas (asterisco), DBA negativas (triángulo). Aumento 250X.

4.2.9 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el Software IBM SPSS Statistics v.22, en el cual se evaluaron los resultados obtenidos de Viabilidad y porcentaje de SSC pre y post Percoll, así como los porcentajes de SSC después de cultivo entre los diferentes tratamientos previamente definidos (Tabla 2). Los datos fueron presentados por la media y su desviación estándar (\pm SD). Primero se evaluó si las poblaciones seguían una distribución normal según la Prueba de Shapiro-Wilk, en el caso de que siguieran esta distribución se empleó la Prueba T-student para muestras relacionadas y la prueba de Wilcoxon como prueba no paramétrica. Se empleó ANOVA y la Prueba de U-Mann Whitney para una distribución normal y no normal, respectivamente. El nivel de significancia empleado fue de 0.05.

5. RESULTADOS

5.1 Parámetros Espermáticos

Se evaluaron las muestras provenientes de 12 pares de testículos de alpaca, que fueron seleccionados de acuerdo al Peso Testicular (mayores a 8 g) y a sus parámetros espermáticos (Anexo N°5), obtenidos de espermatozoides epididimarios. Los valores de concentración espermática de las muestras evaluadas presentaron gran variabilidad con una media de 199.4 millones. ml^{-1} y una alta desviación estándar (± 174.54), el promedio de peso testicular fue de $14.19 \pm 2.51\text{g}$, mientras que la viabilidad y la movilidad espermática tuvieron porcentajes de $67.99 \pm 12.74\%$ y $52.04 \pm 8.96\%$, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de los parámetros espermáticos de las muestras procesadas para el aislamiento de células testiculares.

	<i>Media \pm SD</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>
<i>Promedio de peso testicular (g)</i>	14.19 ± 2.51	18.67	8.12
<i>Concentración Espermática (millones.ml^{-1})</i>	199.4 ± 174.54	619	24.8
<i>Viabilidad Espermática (%)</i>	67.99 ± 12.74	85.47	35.83
<i>Movilidad Espermática (%)</i>	52.04 ± 8.96	64.92	38.52

Se evaluó la correlación entre la concentración de espermatozoides y el promedio de peso testicular para evaluar la utilidad del peso testicular como indicador de producción espermática, sin embargo, no se encontró correlación significativa entre estos parámetros (Figura 10a).

5.2 Aislamiento, concentración y viabilidad de Células Testiculares

Luego de las digestiones enzimáticas se obtuvo una suspensión de células testiculares, que incluye células somáticas, células madre espermatogoniales y eritrocitos (Figura 14a). Las suspensiones celulares obtenidas fueron evaluadas para determinar la concentración celular (millones.ml⁻¹) con Cámara de Neubauer y viabilidad celular por tinción con azul de tripán (Anexo N°6). Los valores de concentración celular mostraron una mayor dispersión siendo el mínimo valor 26.1 millones.ml⁻¹ y el máximo 143 millones.ml⁻¹ dando una media de 89.93 ± 34.55 millones.ml⁻¹, con respecto a la viabilidad celular los valores fueron más uniformes (rango de: 99.6% - 75.3%), teniendo una media de 94.89 ± 6.73% (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración y Viabilidad de células testiculares aisladas de testículos de alpaca
“*Vicugna pacos*”

	<i>Media ± SD</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>
<i>Concentración Celular</i> <i>(millones.ml⁻¹)</i>	89.93 ± 34.55	143	26.1
<i>Viabilidad Celular (%)</i>	94.89 ± 6.73	99.6	75.3

Se correlacionó la viabilidad espermática con la viabilidad celular obtenida luego del aislamiento (Figura 10b), sin embargo, no se encontró un nivel de asociación significativo (p>0.05).

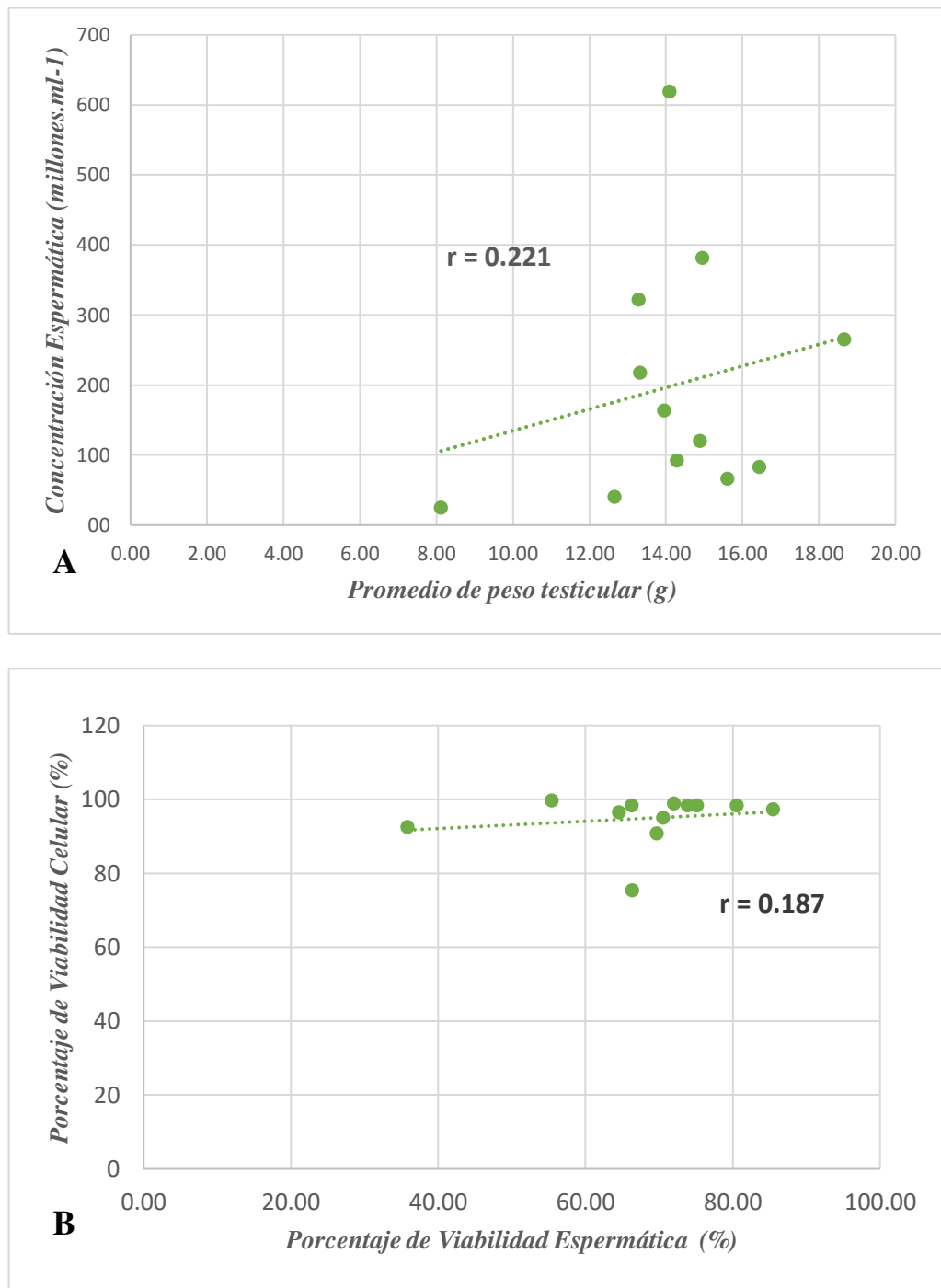


Figura 10. Correlación e índices de correlación entre variables. A. Concentración Espermática vs Promedio de peso testicular ($p > 0.05$), B. Porcentaje de Viabilidad Celular vs Porcentaje de Viabilidad Espermática ($p > 0.05$). r : Coeficiente de Pearson.

5.3 Porcentaje de Células Madre Espermatogoniales luego del aislamiento

Posterior a la evaluación de concentración celular, se extrajo una alícuota de las suspensiones y se evaluó el porcentaje de Células Madre Espermatogoniales en la suspensión de células testiculares por Citometría de Flujo y Microscopía de Fluorescencia, para lo cual se utilizó el conjugado sonda-lectina DBA-FITC (marcador de células madre espermatogoniales). Se reconoció el porcentaje de las tres poblaciones determinadas por el marcador (*sDBA+*, *wDBA+* y *DBA-*, Anexo N° 7 y 8), dando como resultado medias de $22 \pm 5.45\%$ y $46.52 \pm 17.84\%$ para el porcentaje de células madre espermatogoniales. Con respecto a las células en vías de diferenciación los porcentajes obtenidos fueron $38.86 \pm 7.27\%$ y $43.42 \pm 14.32\%$, mientras que las células diferenciadas fueron de $40.39 \pm 14.16\%$ y $10.06 \pm 10.81\%$ (Tabla 6), siendo los primeros porcentajes obtenidos por MF y los segundos por CF. Observamos que en esta primera suspensión obtenida del aislamiento no hay gran confluencia de células redondas que correspondan a la zona de las células madre espermatogoniales (Figura 7a) y se observa mayor presencia de otros tipos celulares.

Tabla 6. Media de los porcentajes de células madre espermatogoniales en la suspensión de células testiculares

	<i>sDBA+</i> (%)	<i>wDBA+</i> (%)	<i>DBA-</i> (%)
<i>MF</i>	22 ± 5.45	38.86 ± 7.27	40.39 ± 14.16
<i>CF</i>	46.52 ± 17.84	43.42 ± 14.32	10.06 ± 10.81

**MF*: Microscopía de Fluorescencia, *CF*: Citometría de Fluorescencia, *sDBA+* (%): porcentaje de células madre espermatogoniales (SSC), *wDBA+* (%): porcentaje de células en diferenciación temprana, *DBA-* (%): porcentaje de células diferenciadas.

El porcentaje de SSC suele estar relacionado a la producción espermática por lo que realizamos un análisis de correlación entre estos, no encontrándose relación significativa alguna (Figura 11a), adicionalmente se analizó la relación entre el promedio de peso testicular y el porcentaje de SSC y tampoco se encontró relación (Figura 11b).

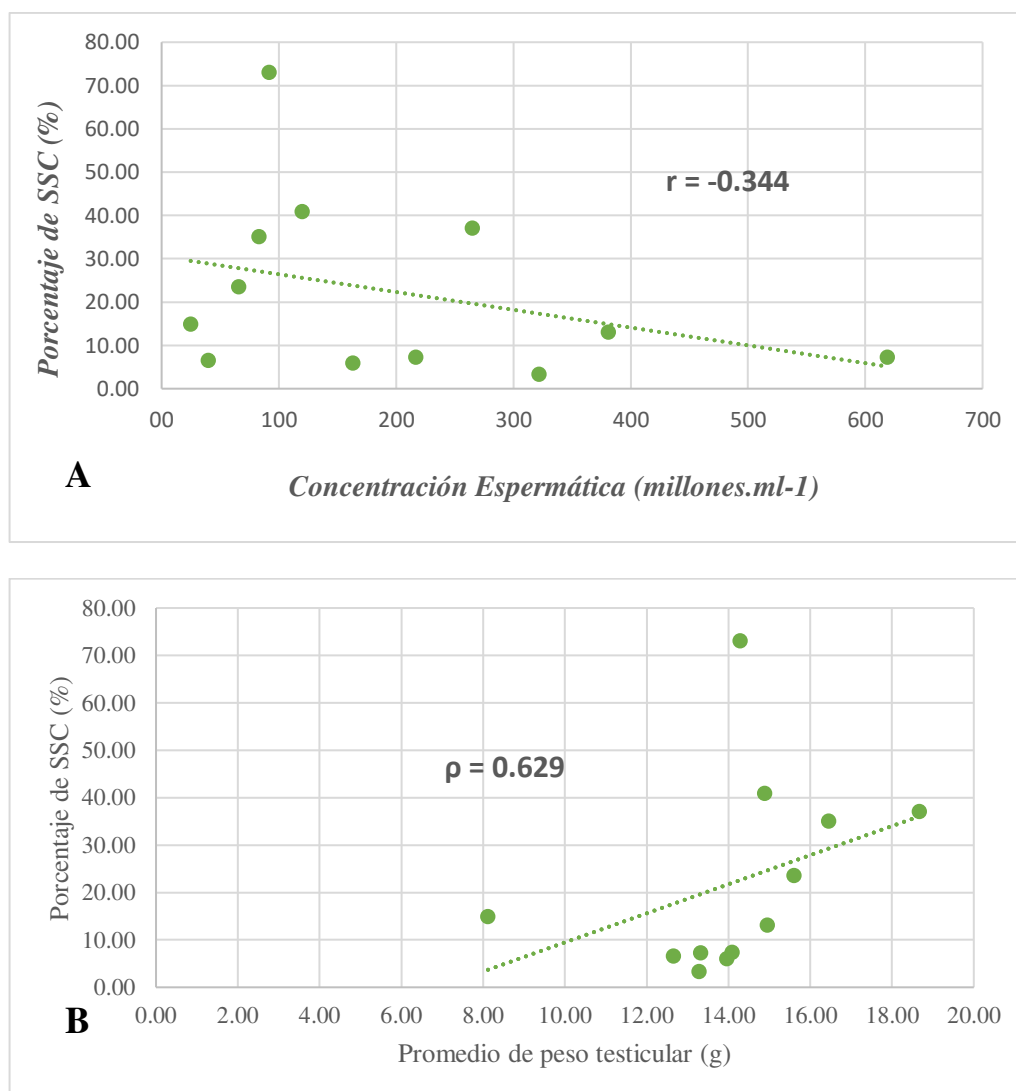


Figura 11. Correlación e índices de correlación entre variables. A. Porcentaje de SSC vs Concentración espermática ($p > 0.05$), B. Porcentaje de SSC vs Promedio de peso testicular ($p < 0.05$). r: Coeficiente de Pearson; ρ : Coeficiente de Spearman.

5.4 Purificación de Células Madre Espermatogoniales por gradientes de Percoll

La concentración de las células purificadas de la fracción de 30% presentó una media de 15.16 ± 9.82 millones. ml^{-1} , teniendo valores muy extremos con un mínimo de 1.10 millones. ml^{-1} y un máximo de 29.30 millones. ml^{-1} . Con respecto a la viabilidad celular se obtuvo una media de 91.33 ± 6.58 %, presentando valores homogéneos para cada muestra (Rango: 97.9% - 72.3%, Tabla 7, Anexo N° 6). La fracción celular obtenida luego de la purificación no presenta eritrocitos y existe homogeneidad en los tipos celulares (Figura 14b).

Tabla 7. Concentración y Viabilidad de células testiculares aisladas post enriquecimiento con gradientes de Percoll.

	<i>Media \pm SD</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>
<i>Concentración Celular post-Percoll (millones.ml^{-1})</i>	15.16 ± 9.82	29.30	1.10
<i>Viabilidad Celular post – Percoll (g%)</i>	91.33 ± 6.58	97.90	72.30

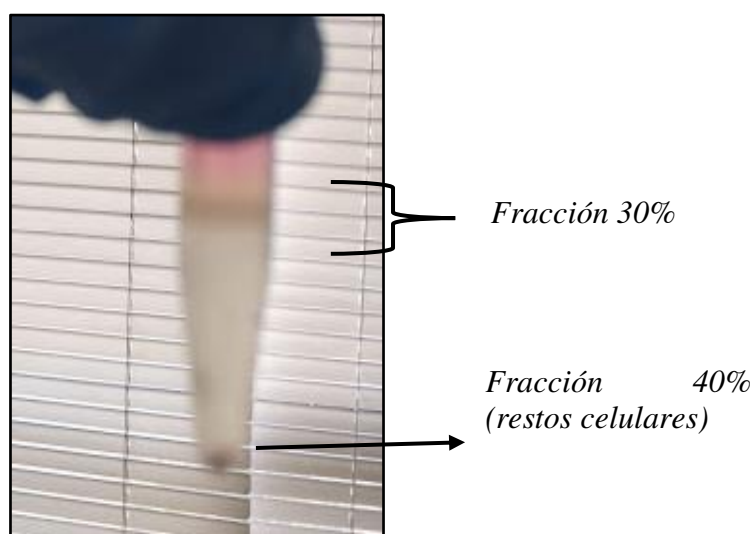


Figura 12. Anillo obtenido luego de la centrifugación con gradientes de Percoll

5.5 Comparación de los porcentajes de Viabilidad celular antes y después del enriquecimiento con gradientes de Percoll

Se evaluó la viabilidad de las células testiculares antes y después del enriquecimiento por gradientes de Percoll evaluada con Azul de tripán no mostró diferencia significativa ($p>0.05$), con lo que se corrobora que el Percoll no ejerce ningún daño en la viabilidad celular (Tabla 8 y Figura 13). Los datos de las poblaciones evaluadas no seguían una distribución normal según la Prueba de Shapiro - Wilk, por lo que se empleó la Prueba de Wilcoxon para ver la diferencia significativa entre ambos grupos.

Tabla 8. Porcentajes de Viabilidad celular obtenidos antes y después del enriquecimiento con Percoll

	<i>Viabilidad Celular pre Percoll (%)</i>	<i>Viabilidad Celular post Percoll (%)</i>
<i>Media \pm SD</i>	94.89 \pm 6.73 ^a	91.33 \pm 6.58 ^a

**Superíndices iguales indican que no existe diferencia significativa entre los valores de viabilidad de ambos grupos ($p>0.05$).*

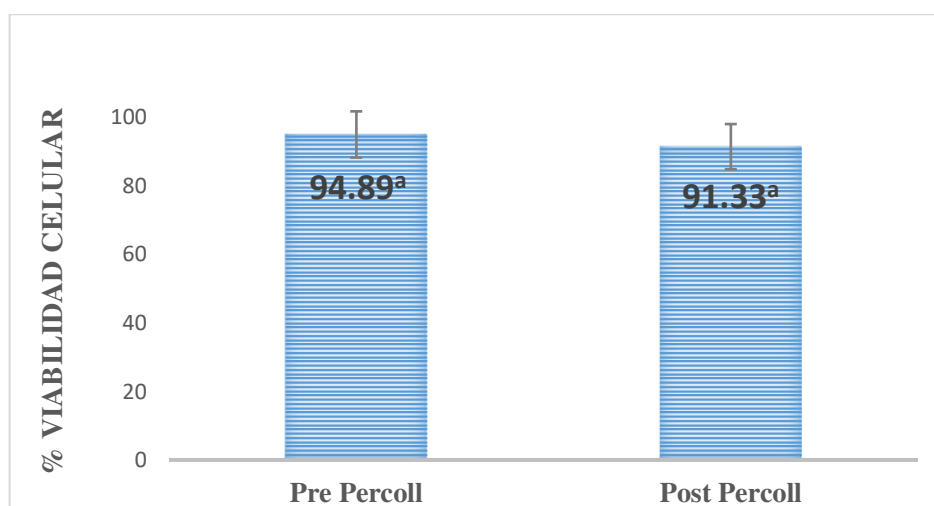


Figura 13. Comparación de la viabilidad celular pre y post enriquecimiento con gradientes de Percoll.

**Los porcentajes de viabilidad celular no muestran diferencia significativa pre y post Percoll ($p<0.05$).*

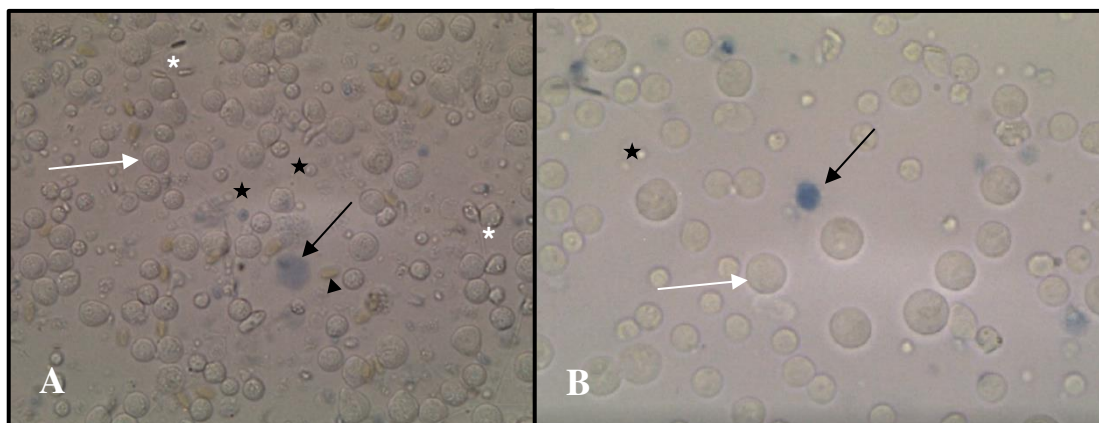


Figura 14. Imágenes de viabilidad celular por tinción con azul de Tripán. A. Pre Percoll, B. Post Percoll. Se observa células madre espermatogoniales vivas (flechas blancas), muertas (flechas negras), células somáticas (estrella), espermatozoides (asterisco) y eritrocitos (triángulo). Aumento 400X

5.6 Comparación de Porcentaje de SSC antes y después del enriquecimiento con Percoll por Citometría de Flujo y Microscopía de fluorescencia

Las tres distintas poblaciones celulares obtenidas (sDBA+, wDBA+, DBA-) con el marcaje del conjugado DBA-FITC, muestran que existe una mayor confluencia de células redondas en la zona de las SSC (Figura 7b) y una mayor frecuencia con respecto a estas células después de pasar por Percoll comparado al pre Percoll (Figura 15 y Figura 17). Por Microscopía de Fluorescencia se evaluaron 8 muestras (Anexo N° 7) y los resultados obtenidos muestran un mayor porcentaje de células madre espermatogoniales (SSC) post Percoll ($49.68 \pm 10.90 \%$) en comparación a la inicial ($22 \pm 5.45 \%$), caso contrario al porcentaje de células madre en diferenciación temprana que reduce con la utilización del Percoll a un 17 ± 5.62 , 21% menor que el inicial (38.86 ± 7.27), y por último comparando el porcentaje de células diferenciadas estas también reducen en porcentaje a un $33.33 \pm 10.17 \%$ frente al inicial de $40.39 \pm 14.16 \%$. Los porcentajes de las poblaciones correspondientes a

las SSC y las células en diferenciación temprana muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos, indicando que el Percoll si enriquece la fracción de Células madre espermatogoniales y disminuye la población de células en diferenciación temprana, mientras que, si bien se observa un menor porcentaje de células diferenciadas después de la purificación con Percoll, no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$, Tabla 9 y Figura 16).

Tabla 9. Evaluación por Microscopia de Fluorescencia del porcentaje de Células madre espermatogoniales, Células madre en diferenciación temprana y células diferenciadas pre Percoll (inicial) y post Percoll.

	<i>sDBA+</i> (%)	<i>wDBA+</i> (%)	<i>DBA-</i> (%)
<i>Pre Percoll</i>	22 ± 5.45^a	38.86 ± 7.27^a	40.39 ± 14.16^a
<i>Post Percoll</i>	49.68 ± 10.90^b	17 ± 5.62^b	33.33 ± 10.17^a

*Los porcentajes en la misma columna y con superíndices distintos muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). *sDBA+*(%): porcentaje de células madre espermatogoniales, *wDBA+*(%): porcentaje de células en diferenciación temprana, *DBA-*(%): porcentaje de células diferenciadas.

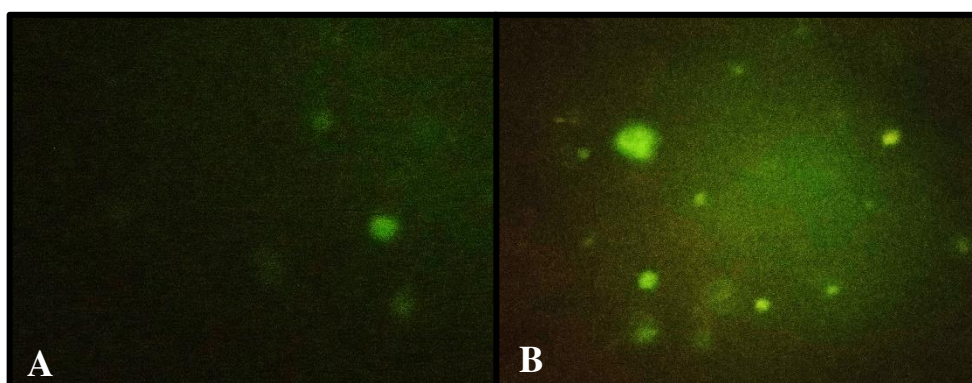


Figura 15. Comparación de imágenes tomadas por Microscopía de Fluorescencia entre tratamientos. A. Pre Percoll, B. Post Percoll. Aumento 250X

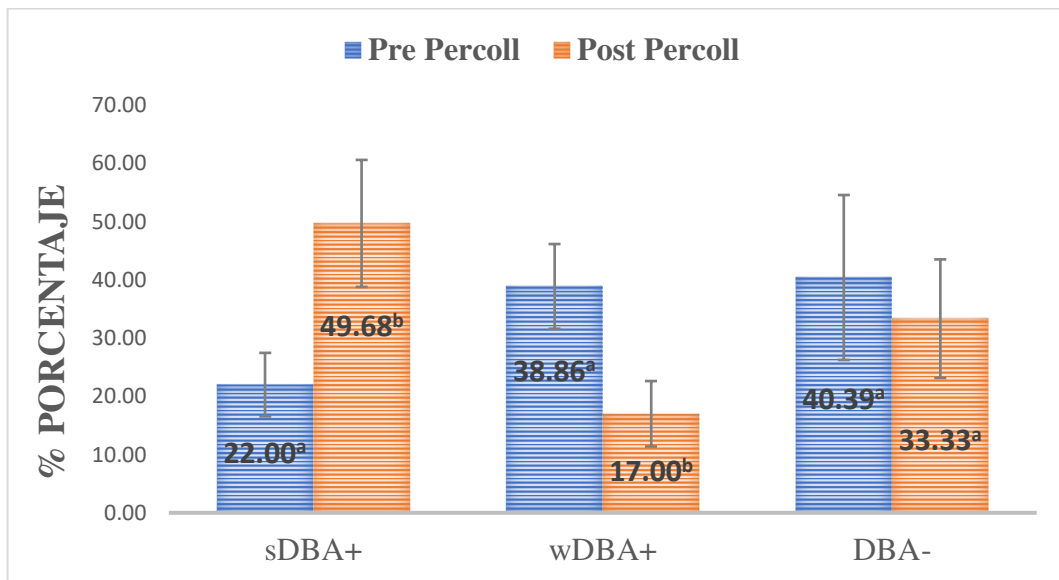


Figura 16. Porcentajes de las tres poblaciones de células redondas caracterizadas con DBA-FITC (sDBA+, wDBA+ y DBA-) por Microscopía de Fluorescencia Pre Percoll (inicial) y Post Percoll.

**Los porcentajes muestran diferencia significativa entre tratamientos con respecto a cada población celular ($p < 0.05$). sDBA+: Células madre espermatogoniales (SSC), wDBA+: células en diferenciación temprana, DBA-: células diferenciadas.*

Las muestras evaluadas por Citometría de Fluorescencia ($n=4$, Anexo N° 8) con el mismo marcador (DBA-FITC) obtuvieron una media de $46.52 \pm 17.84\%$ para la población de SSC (sDBA+) correspondiente al Pre Percoll, viéndose un aumento de esta población después del empleo del Percoll ($83.72 \pm 8.5\%$), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Con respecto a la población de células en vías de diferenciación (wDBA+) el porcentaje disminuyó de $43.42 \pm 14.32\%$ (pre Percoll) a $15.31 \pm 8.13\%$ después de la purificación con Percoll, siendo significativamente diferente las medias ($p < 0.05$), la disminución en los porcentajes también se observó en la población de células diferenciadas (DBA-) siendo inicialmente $10.06 \pm 10.81\%$ (pre Percoll) y finalmente la media fue de $0.97 \pm 0.37\%$ (post Percoll), sin embargo esta diferencia no muestra significancia estadísticamente ($p > 0.05$, Tabla 10 y Figura 18). La evaluación del porcentaje de SSC por Microscopía

de Fluorescencia como por Citometría de Flujo comprueban que el método de Percoll enriquece la población de células madre espermato goniales (sDBA+).

Tabla 10. Porcentajes de la población de Células Madre Espermato goniales, Células en diferenciación temprana y células diferenciadas caracterizadas con DBA-FITC y evaluadas por Citometría de Flujo en los tratamientos pre Percoll (inicial) y post Percoll.

	<i>sDBA+ (%)</i>	<i>wDBA+ (%)</i>	<i>DBA- (%)</i>
<i>Pre Percoll</i>	46.52 ± 17.84 ^a	43.42 ± 14.32 ^a	10.06 ± 10.81 ^a
<i>Post Percoll</i>	83.72 ± 8.5 ^b	15.31 ± 8.13 ^b	0.97 ± 0.37 ^a

*Los porcentajes en la misma columna y con superíndices distintos muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). *sDBA+ (%)*: porcentaje de células madre espermato goniales, *wDBA+ (%)*: porcentaje de células en diferenciación temprana, *DBA- (%)*: porcentaje de células diferenciadas.

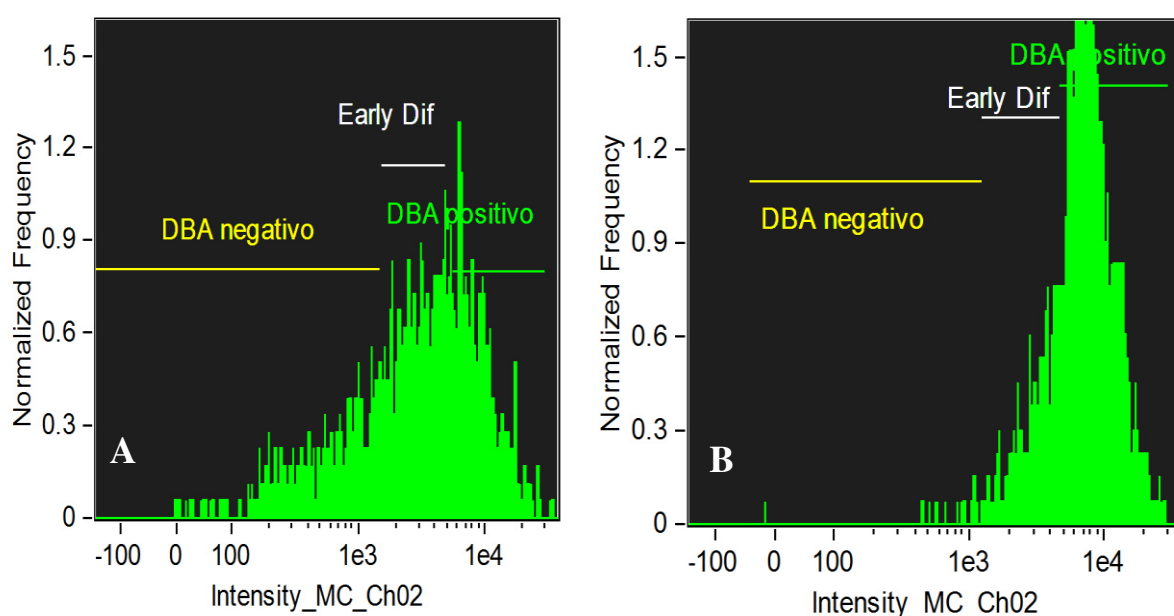


Figura 17. Comparación de poblaciones celulares evaluadas por Citometría de Flujo. A. Pre Percoll, B. Post Percoll. DBA positivo: Células madre espermato goniales, Early Dif: Células en diferenciación temprana, DBA negativo. Células diferenciadas.

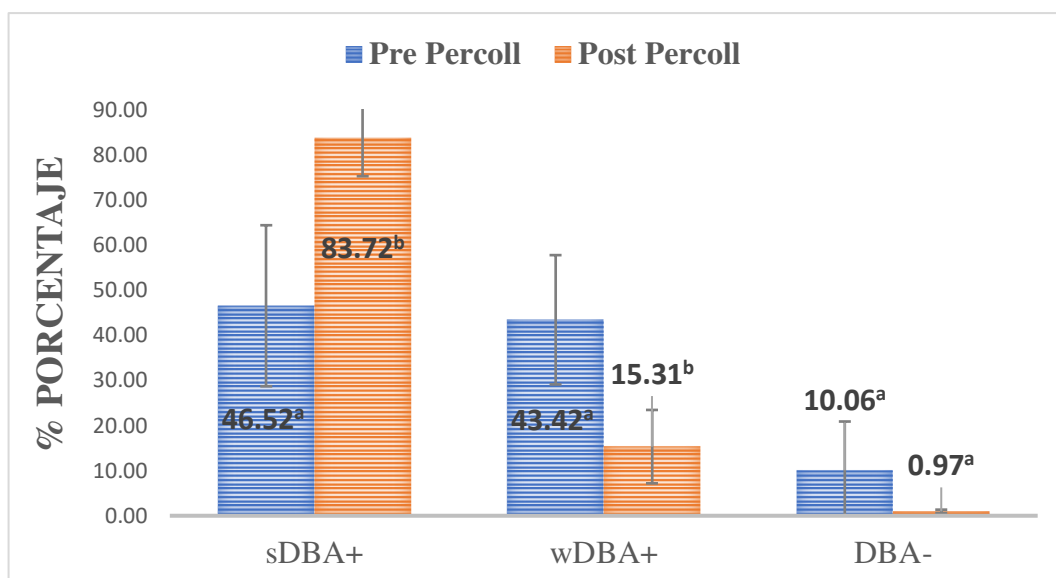


Figura 18. Comparación de los porcentajes de las tres poblaciones caracterizadas por el DBA – FITC (sDBA+, wDBA+ y DBA-) Pre Percoll (inicial) y Post Percoll, evaluadas por Citometría de Flujo.

**Los porcentajes muestran diferencia significativa entre tratamientos con respecto a cada población celular ($p < 0.05$). sDBA+: Células madre espermatogoniales (SSC), wDBA+: células en diferenciación temprana, DBA-: células diferenciadas.*

5.7 Evaluación de Viabilidad celular durante el cultivo

Se realizó un seguimiento continuo de los cultivos y se evaluaron las viabilidades en el día 3 y día 6 en todos los grupos (Anexo N°9). Las medias de los porcentajes de Viabilidad entre los grupos de tratamiento no mostraron diferencia significativa en el día 3 ni en el día 6 de cultivo, según el estadístico ANOVA, pero se observa una tendencia con respecto a que el mayor valor para el porcentaje de viabilidad celular perteneció al grupo Control para ambos días ($83.08 \pm 7.72\%$ y $75.87 \pm 8.29\%$) y el menor valor se encontró en el grupo Gelatina ($75.05 \pm 4.69\%$ y $68.69 \pm 5.75\%$) en ambos días (Tabla 11 y Figura 19). Sin embargo, si comparamos los porcentajes de viabilidad con respecto a los días de cultivo si se observa diferencia significativa entre el día inicial y el día 3 en todos los grupos, solo en el grupo Gelatina se observa diferencia significativa entre el día 3 y día 6, el día 0 y día 6 también son diferentes significativamente.

Tabla 11. Porcentajes de viabilidad celular entre los grupos Control, Percoll, Gelatina y DBA en los días 0, 3 y 6 de cultivo In vitro.

	<i>DIA 0</i>	<i>DIA 3</i>	<i>DIA 6</i>
<i>Control</i>	94.89 ± 6.73 ^a	83.08 ± 7.72 ^b	75,87 ± 8,29 ^b
<i>Percoll</i>		78.84 ± 1,95 ^b	74,43 ± 7,12 ^b
<i>Gelatina</i>	91.33 ± 6.58 ^a	75,05 ± 4,69 ^b	68,69 ± 5,75 ^b
<i>DBA</i>		78,53 ± 3,56 ^b	74,76 ± 8,55 ^b

**Superíndices iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa entre los grupos evaluados ($p > 0.05$), entre columnas si muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). 'Grupo Gelatina muestra diferencia significativa entre en día 3 y 6 de cultivo*

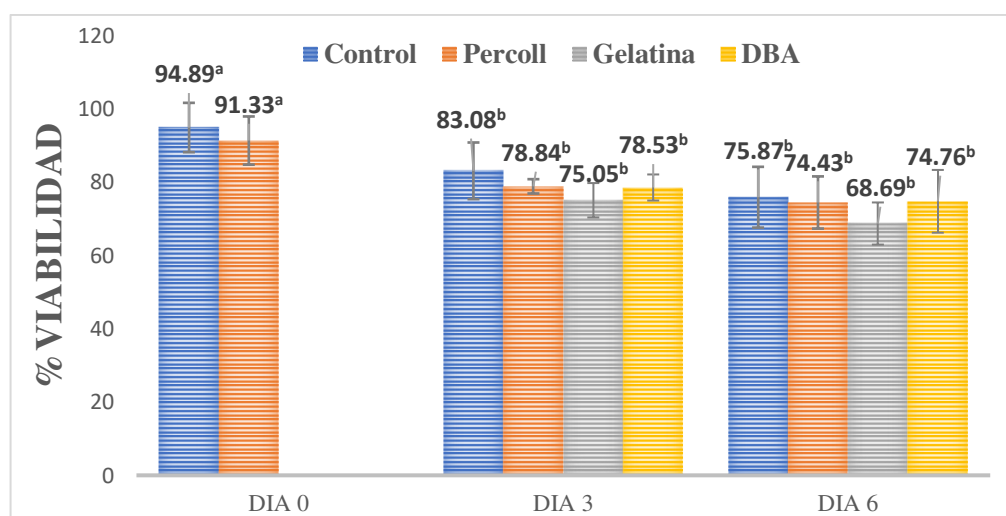


Figura 19. Comparación de viabilidad celular en los días 3 y 6 de cultivo in vitro entre los cuatro grupos evaluados

**Superíndices distintos muestran diferencia significativa entre días para todos los grupos de tratamiento ($p < 0.05$).*

Durante el monitoreo de los cultivos también se observó el progreso de la proliferación celular por medio de la formación de colonias de células madre espermátogoniales en todos los grupos de tratamiento, observándose en los grupos

Percoll, Gelatina y DBA la formación de colonias en el día 3, sin embargo, estas fueron disminuyendo para el día 6 de cultivo (Figura 20).

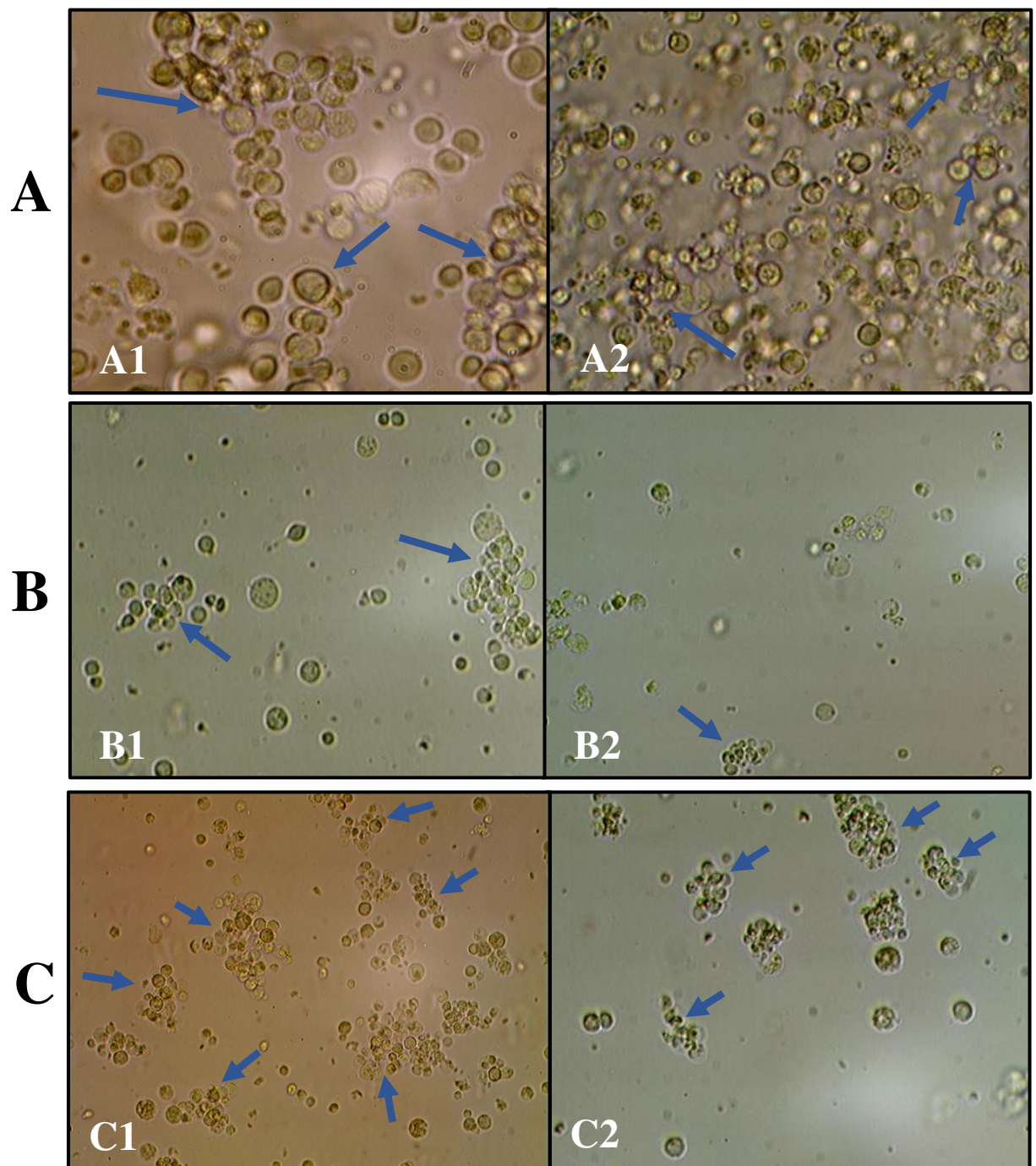


Figura 20. Cultivos del Grupo Percoll (A), Grupo Gelatina (B) y Grupo DBA (C) en el día 3 (A1, B1, C1) y día 6 (A2, B2, C2) de cultivo, se observan colonias (Flechas azules). Aumento 400X (A), Aumento 100X (B, C).

Con respecto al Grupo Control la aparición de colonias tomó más tiempo que los otros grupos observándose unas cuantas colonias el día 6 de cultivo (Figura 21).

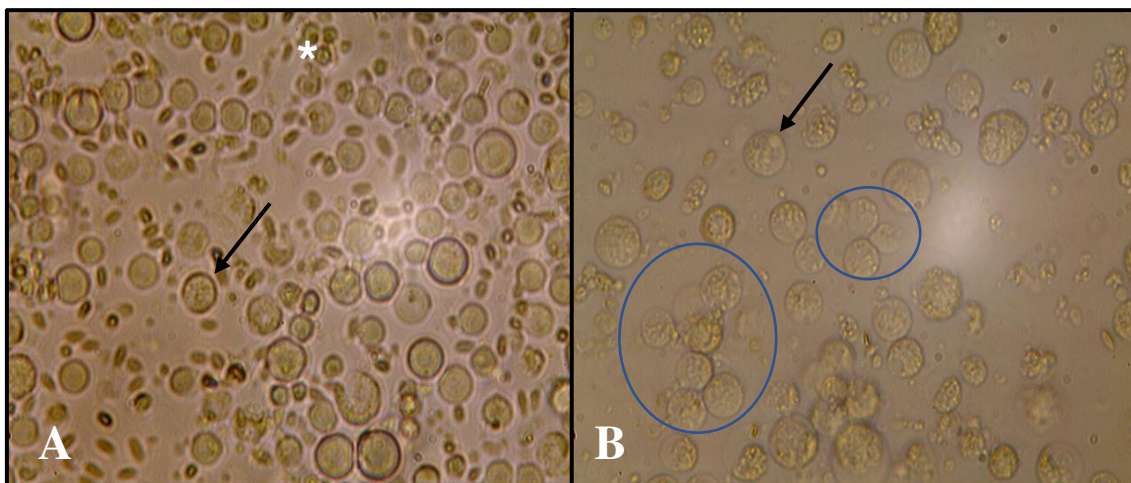


Figura 21. Células cultivadas del Grupo Control. A. Día 3, B. Día 6. Células madres espermatogoniales (flechas), células somáticas (asterisco), colonias de células madre espermatogoniales (círculos azules). Aumento 400X.

5.8 Evaluación del porcentaje de Células Madre Espermatogoniales luego del cultivo entre Grupos de Tratamiento

Luego de 8 días de cultivo *In vitro* se evaluó el porcentaje de células madre espermatogoniales (sDBA+). Las células después del tiempo cultivo establecido fueron fijadas para su posterior evaluación por Citometría de flujo o Microscopia de fluorescencia con el marcaje del conjugado DBA-FITC. La evaluación final consistió en evaluar la influencia de las matrices extracelulares (Grupo Gelatina y Grupo DBA) en el porcentaje de células madre espermatogoniales post cultivo, así como el porcentaje de los grupos Control y Percoll (Anexo N° 10 y 11).

Por Microscopía de Fluorescencia la media obtenida para el porcentaje de Células Madre Espermatogoniales (Tabla 12, Figura 22) en el Grupo Control fue de $44.48 \pm 6.34\%$, seguido del Grupo Gelatina con una media de $46.36 \pm 4.14\%$ y por el Grupo Percoll con un porcentaje de $46.36 \pm 4.14\%$, mientras que la mayor media fue obtenida por el Grupo DBA con $63.28 \pm 5.61\%$, siendo este resultado

significativamente distinto al obtenido por los otros grupos de tratamiento ($p < 0.05$). Por medio de esta técnica se observó la presencia de colonias de SSC en todos los tratamientos, así como células en diferenciación temprana que suelen situarse en la periferia de la colonia (Figura 23).

Tabla 12. Porcentajes de Células madre espermato goniales post cultivo en los grupos Control, Percoll, Gelatina y DBA evaluadas por Microscopía de Fluorescencia.

	<i>Control</i>	<i>Percoll</i>	<i>Gelatina</i>	<i>DBA</i>
sDBA+ (%)	44.48 ± 6.34^a	52.38 ± 5.64^a	46.36 ± 4.14^a	63.28 ± 5.61^b

**Superíndices distintos muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). sDBA+(%): Células Madres Espermato goniales.*

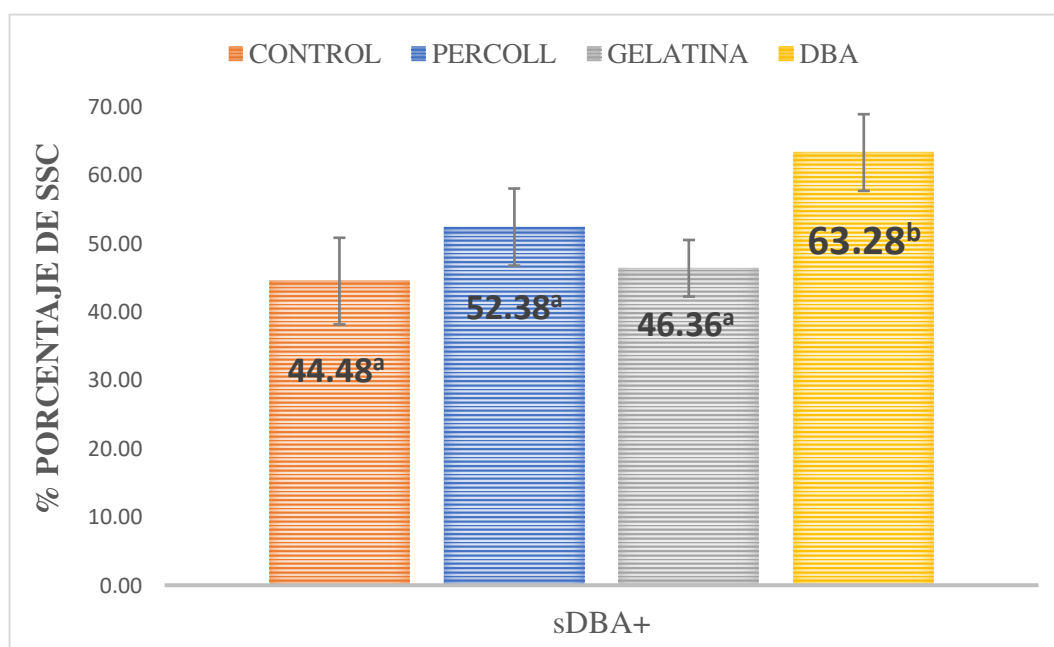


Figura 22. Evaluación del Porcentajes de células madre espermato goniales post cultivo entre los distintos grupos de Tratamiento evaluado por Microscopía de Fluorescencia.

**Superíndices distintos muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). sDBA+(%): Células Madres Espermato goniales.*

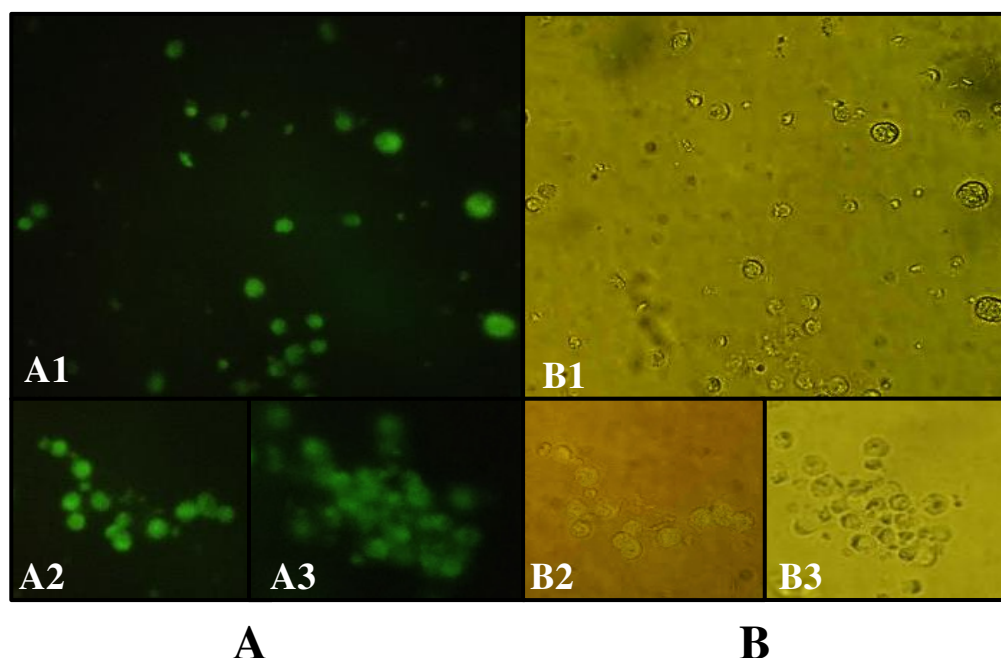


Figura 23. Células evaluadas por Microscopía de Fluorescencia. A. Campo oscuro, B. Campo claro. Células solas (A1, B1) y colonias celulares (A2, A3, B2, B3). Aumento 250X.

Las muestras evaluadas por Citometría de Flujo muestran un menor porcentaje de células madre espermatogoniales en el Grupo Control ($52.60 \pm 23.44\%$), mientras que el mayor porcentaje fue para el Grupo DBA con una media de $66.9 \pm 10.34\%$. Con respecto al Grupo Percoll el porcentaje fue de $57.95 \pm 20.2\%$ y en el Grupo Gelatina fue de $53.05 \pm 17.73\%$ (Tabla 13 y Figura 24). Sin embargo, ninguno de los tratamientos mostró diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$).

Tabla 13. Porcentajes de Células madre espermatogoniales post cultivo en los grupos Control, Percoll, Gelatina y DBA evaluados por Citometría de Flujo.

	<i>Control</i>	<i>Percoll</i>	<i>Gelatina</i>	<i>DBA</i>
<i>sDBA+</i> (%)	52.60 ± 23.44^a	57.95 ± 20.2^a	53.05 ± 17.73^a	66.9 ± 10.34^a

*Superíndices iguales no muestran diferencia significativa entre Grupos de Tratamiento ($p > 0.05$). *sDBA+*(%): Células Madres Espermatogoniales.

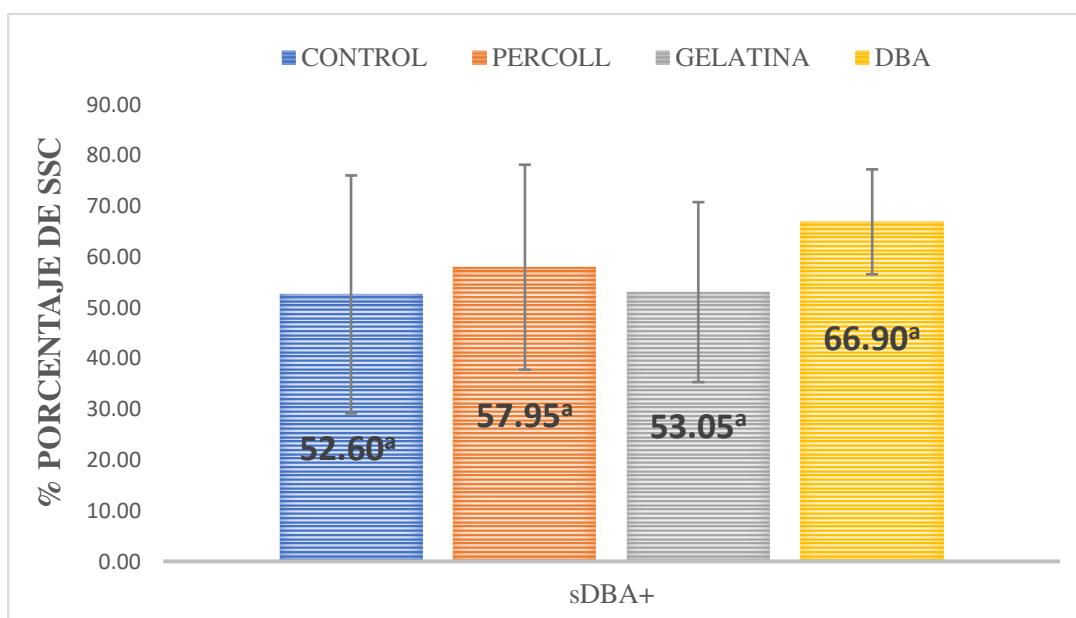


Figura 24. Comparación de Porcentajes de células madre espermatogoniales post cultivo entre grupos de Tratamiento evaluados por Citometría de Flujo.

**Superíndices iguales no muestran diferencia significativa ($p > 0.05$). sDBA+(%): Células Madres Espermatogoniales.*

6. DISCUSIÓN

La importancia de las SSC radica en que son responsables del mantenimiento de la fertilidad del individuo, se encargan de la formación de los espermatozoides (Phillips *et al.*, 2010), por lo que el desarrollo de técnicas de aislamiento y de mejorar las condiciones de cultivo para poder mantener sus propiedades es necesario para un tratamiento de infertilidad a futuro (Han *et al.*, 2009), para lo que necesitamos mayores cantidades de este tipo de células. El cultivo *In vitro* es una herramienta que posibilita la proliferación de SSC, teniendo en cuenta el pequeño porcentaje de estas células *In vivo* (Aponte *et al.*, 2008). Los modelos más ampliamente estudiados en este campo han sido el modelo murino, bovinos y humanos (Van Pelt *et al.*, 1996; Izadyar *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011).

En el caso de la alpaca, una especie que padece de múltiples deficiencias reproductivas que impactan en la calidad de los productos derivados de esta, el cultivo *In vitro* brinda múltiples aplicaciones y permite conservar el material genético de los individuos de la especie con características deseables. Es por eso que en este trabajo de investigación se aislaron células madre espermatogoniales a partir de testículos de alpaca *Vicugna pacos* para purificarlas, cultivarlas *In vitro* y evaluar el efecto de una matriz extracelular como la gelatina y la molécula de lectina DBA en el mantenimiento de las características de las SSC y lograr sostener su proliferación.

En primer lugar, para tener datos más completos de las muestras evaluadas, se tomó en cuenta los parámetros espermáticos evaluados a partir de espermatozoides epididimarios para poder relacionarlos a la capacidad fecundante de los individuos, se evaluó la calidad de estos por medio de la viabilidad, movilidad y concentración espermática, además del promedio de peso testicular. El peso testicular obtenido en este estudio fue de 14.19 ± 2.51 g muy aproximado al promedio para animales adultos en esta especie, mayores de 8g (Valdivia *et al.*, 2019a) y de 15 a 18g (Bravo *et al.*, 2000), con respecto a la concentración de espermatozoides los resultados han sido

muy variable desde 619 millones a 24.8 millones de espermatozoides por mililitro, lo que se corresponde con otros trabajos realizados en semen de alpaca donde se encuentran animales azoospermicos así como animales con gran cantidad de espermatozoides por mililitro (Bravo *et al.*, 2000; Urquieta *et al.*, 2005), se encuentra de que mientras mayor sea la frecuencia de eyaculación, esto ocasionará la disminución de la cantidad de espermatozoides generando una baja fertilidad (Bravo *et al.*, 1997) y otra causa es un mayor periodo sin actividad sexual lo que genera que los espermatozoides almacenados en el epidídimo pierdan viabilidad y exista mayor cantidades de anormalidades (Urquieta *et al.*, 2005). Con respecto a la movilidad y viabilidad espermática obtenemos medias de $67.99 \pm 12.74\%$ y $52.04 \pm 8.96\%$, respectivamente. Algunos estudios muestran que porcentajes de movilidad mayor al 30% y una concentración espermática de 50 millones/mL (Evangelista-Vargas *et al.*, 2016), por lo que los parámetros espermáticos de las muestras utilizadas en su gran mayoría dan buenos indicios con respecto al animal muestreado para este estudio. Nuestros resultados se asemejan a los obtenidos para espermatozoides epididimarios de alpaca en la investigación de Canorio (2015).

Con respecto a muestras eyaculadas la concentración espermática es muy baja y variable dependiendo del método de colecta, siendo en promedio 100 millones de espermatozoides/mL (Santiani *et al.*, 2005) y los parámetros de movilidad y viabilidad espermática en estas muestras suelen ser mayores (Bravo *et al.*, 2000). Sin embargo, debemos de tener en cuenta que los animales empleados para este trabajo de investigación no son animales reproductores sino son individuos destinados al consumo (animales beneficiados), por lo cual los parámetros espermáticos no son los deseables en algunos animales, además el tiempo de transporte post mortem hasta la llegada al laboratorio afectan los parámetros espermáticos, sin embargo, se seleccionaron las muestras de animales que cumplían con los parámetros establecidos por WHO (2010). Se ha encontrado que en el caso de alpacas existe

relación entre el tamaño testicular y la producción de espermatozoides (Abraham *et al.*, 2016), en este trabajo hemos correlacionado estos parámetros y el índice de correlación es muy bajo y no significativo, por lo que se podría sugerir que otras condiciones influyen en esta relación como la nutrición, edad, peso, genética, etc (La Manna *et al.*, 2011). Sin embargo, debido a la procedencia de estas muestras es difícil tener acceso a esta información adicional.

Las suspensiones celulares, aisladas de cada muestra testicular fueron evaluadas para ver su concentración y viabilidad inicial. Esta última permite demostrar que la célula posee una membrana funcional o íntegra, con actividad metabólica activa, por medio de ensayos de exclusión como la tinción con azul de Tripán que penetran en el caso de que la célula este dañada (Strober, 2015). La concentración de células testiculares fue de 89.93 ± 34.55 millones/mL, sin embargo, este parámetro es mejor expresarlo por gramo de testículo trabajado (3g por testículo), por lo que la concentración es de aproximadamente 29.9 millones/g. Este resultado es mayor al obtenido por otros trabajos en alpaca de 15 millones/g (Vasquez, 2018). En otras especies se han obtenido valores similares como en ratas que se observa 30 millones de células testiculares (Bucci *et al.*, 1986), en bovino y porcino el valor es más alto de 60 y 80 millones por gramo respectivamente (Herrid *et al.*, 2009; Awang-Junaidi *et al.*, 2018), mucho mayor a la obtenida en alpaca. La viabilidad celular obtenida por tinción con azul de Tripán fue de $94.89 \pm 6.73\%$, un valor mucho mayor al obtenido en otros estudios de 70% en el mismo tipo de células de alpaca (Vasquez, 2018; Valdivia *et al.*, 2019a) y se ha observado que la viabilidad celular de las alpacas en promedio es de 89% (Huamani, 2018). Si bien existen ciertas diferencias entre especies con respecto a la espermatogénesis y los tipos de células involucradas en este proceso, las SSC suelen tener características similares como su ubicación histológica (membrana basal de los túbulos seminíferos) y morfología celular que indica que son de gran tamaño y tiene un gran núcleo (Kim *et al.*, 2014). Esta última

característica se tomó en cuenta para evaluar la viabilidad y concentración celular ya mencionados. La alta viabilidad celular obtenida puede relacionarse al método de aislamiento empleado ya que la digestión enzimática se caracteriza por obtener suspensiones celulares muy homogéneas, con alta viabilidad y capacidad de adherirse a un sustrato (Kubota *et al.*, 2004). Se evaluó también la correlación entre la viabilidad celular y la viabilidad espermática mostrando un índice muy bajo de correlación y no significativo, pudiendo estar afectado por múltiples condiciones mencionadas anteriormente.

La identificación de las SSC se realizó mediante Citometría de Flujo (CF) y Microscopía de Fluorescencia (MF), ambas metodologías son usadas para el reconocimiento y cuantificación de distintos tipos celulares por medio del empleo de fluorocromos y la excitación de estos (Basiji *et al.*, 2007; Stockert y Blázquez, 2017). Sin embargo, la diferencia principal es la gran cantidad de células que cada metodología puede evaluar en un menor tiempo y una mayor sensibilidad, siendo el Citómetro de Flujo más eficiente en este aspecto, mientras que por Microscopía de Fluorescencia podemos evaluar la interacción entre las células (formación de colonias), lo que no es posible por Citometría de Flujo ya que se emplean células en suspensión y monodispersadas (Godfrey *et al.*, 2005). El conjugado DBA-FITC empleado en este estudio, ya ha sido utilizado en el reconocimiento de SSC de alpacas macho adultos (Valdivia *et al.*, 2019a) y en otras especies como bovino y porcino (Herrid *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2009). Esta lectina ha permitido reconocer dos tipos de poblaciones de acuerdo a la diferencia en la intensidad de fluorescencia entre las células, lo que se debería a la variación en la cantidad de ligandos de DBA de la superficie celular producto de un estado de diferenciación (Nash *et al.*, 2007). En el caso de alpaca se ha obtenido un mayor rendimiento de SSC en alpacas de menos de un año de edad (Huamani, 2018; Mujica, 2018). La edad del individuo a partir del cual se hace la extracción y el posterior aislamiento de células madre

espermatozonias es determinante para poder obtener una mayor cantidad de SSC además de un mayor porcentaje de viabilidad de estas células (Erazo, 2017; Kitamura *et al.*, 2018). Debido a que los animales empleados en este trabajo de investigación eran animales beneficiados, en su totalidad son animales adultos, por lo cual se trabajó con muestras de un peso mayor a 8 gramos.

En esta investigación también diferenciamos dos poblaciones de SSC con el empleo de la lectina DBA por MF y CF, se obtuvo un porcentaje de $22 \pm 5.45\%$ y $46.52 \pm 17.84\%$ para las SSC, respectivamente. Los porcentajes de células en vías de diferenciación fueron de $38.86 \pm 7.27\%$ y $43.42 \pm 14.32\%$, mientras que las células redondas diferenciadas obtuvieron porcentajes de $40.39 \pm 14.16\%$ y $10.06 \pm 10.81\%$ (incluye espermatozonios, espermátidas y otras células somáticas). Estos resultados muestran nuevas tasas con respecto a la población de células germinales en alpaca (SSC), ya que en otros estudios se obtiene un porcentaje de SSC de alpaca del 4%, mientras que las células en diferenciación temprana se encontraban en 37% y más del 50% fueron células diferenciadas (Valdivia *et al.*, 2019b; Vasquez, 2018). Estas diferencias se pueden deber a la calidad de las muestras con la cuales se trabajó porque en nuestro estudio la viabilidad celular también es alta con respecto a otros. En otras especies se ha obtenido un rendimiento de espermatozonias de tipo A del 25% (Izadyar *et al.*, 2002) y en rata ha representado hasta un 30% de las células totales (Morena *et al.*, 1996)

Se ha visto que existe relación entre casos de oligospermia (poca concentración de espermatozonios) y una disminución en el porcentaje de células madre espermatozonias en humano (Mclaren, 1998), por lo que se correlaciono estas variables para evaluar cómo se comportaban en el caso de alpaca y no se encontró relación alguna, como ya mencionamos anteriormente la concentración espermática es muy variable y depende de muchos factores (La Manna *et al.*, 2011), pero al relacionar el porcentaje de SSC con el promedio de peso testicular, el índice de

correlación indica una asociación media entre estas variables, por lo que podemos emplear el peso testicular como indicador de la cantidad de SSC.

Como ya hemos visto, la suspensión testicular no solo contiene los distintos tipos de espermatogonia (indiferenciadas y diferenciadas), sino también células de Sertoli, células de Leydig y células mioides (Kubota *et al.*, 2004), es por esto el pequeño porcentaje obtenido de SSC y la necesidad de enriquecer esta fracción (Heidari *et al.*, 2014). En este trabajo se empleó las gradientes de densidad de Percoll como método de purificación de espermatogonias tipo A que ha sido ampliamente utilizado en la purificación de SSC de diversos animales domésticos (Wang *et al.*, 2015), este procedimiento permite disminuir la cantidad de células somáticas en el cultivo ya que estas suelen restringir el crecimiento de las SSC (Kubota *et al.*, 2004). Se obtuvo de la fracción del 30% porcentajes de SSC post Percoll de $49.68 \pm 10.9\%$ por MF y $83.72 \pm 8.5\%$ por CF, las células en diferenciación temprana obtuvieron medias de $17 \pm 15.62\%$ (MF) y $15.31 \pm 8.13\%$ (CF) mientras que las células diferenciadas, $33.33 \pm 10.17\%$ (MF) y $0.97 \pm 0.37\%$ (CF). Estos porcentajes muestran diferencia significativa con sus respectivos iniciales ($p < 0.05$) en ambas metodologías, con lo que podemos decir que el Percoll si permitió enriquecer la fracción de SSC considerablemente. Estos resultados son similares a los obtenidos en bovino donde se muestra que el porcentaje de SSC obtenido después del aislamiento fue de 15% mientras que después del Percoll fue de 52%, mejorando con el método de plaqueo diferencial a 63%, estos resultados se registraron por tinción positiva con DBA (Kitamura *et al.*, 2018b), encontrándose porcentajes muy similares con el marcador UCHL1, en otro estudio se alcanza un 40% de SSC en la fracción de 40%-50% (Kim *et al.*, 2014) y en el caso de SSC de perro se obtuvo un 63% luego del enriquecimiento con Percoll (Gonzales Figueroa, 2015). Otro estudio muestra el 51% de SSC de cerdos alcanzado por este método y evaluado por la actividad de la Fosfatasa Alcalina (Han *et al.*, 2009).

En cambio, en otros estudios el enriquecimiento fue mayor como un 90% de SSC de cabra en las fracciones de 30-32% de gradientes de percoll (Heidari *et al.*, 2014) evidenciada por medio del marcador PGP 9.5. Debido a que a la fecha no existe un método único para el aislamiento y enriquecimiento de las células madre espermatozonales de tipo A. (Mohamadi *et al.*, 2012), para lograr una mayor tasa de enriquecimiento se suelen combinar métodos de purificación, en porcino se han logrado valores del 80% de SSC al emplear plaqueo diferencial con MACS o FACS (Yang *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2014), ya que como observamos si bien se logra separar a las poblaciones esto no es del todo eficiente en todas las muestras observándose gran variabilidad, debemos de tener en cuenta que las SSC y su primera hija comprometida a la vía de diferenciación son muy difíciles de distinguir entre si desde un punto morfológico, lo que dificulta su aislamiento, cultivo y posterior caracterización (Aponte y De Rooij, 2008; Zhang *et al.*, 2016). Con respecto a la viabilidad observamos que existe una pequeña disminución de $94.89 \pm 6.73\%$ (pre Percoll) a $91.33 \pm 6.58\%$ (post Percoll), sin embargo, esto no es significativo, por lo que el método del Percoll resulta inocuo para las células. La viabilidad obtenida después de este método es mayor al 90% en muchos estudios (Marret & Durand, 2000; Herrid *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2014), e incluso la viabilidad post Percoll es mayor a la pre Percoll ya que este método también permite separar células vivas de muertas, (Heidari *et al.*, 2014).

Los tratamientos empleados durante el cultivo *In vitro* fueron hechos para optimizar las condiciones de cultivo y encontrar aquella en la cual las SSC de alpaca pudieran sobrevivir mejor y proliferar, para lo cual solo se realizó un cultivo de corto plazo (8 días) ya que los cultivos largos solo han sido establecidos en murino (Kitamura *et al.*, 2018b), en bovino y porcino se han implementado métodos para mejorar las tasas de rendimiento de las SSC a largo plazo, sin embargo los requerimientos del cultivo dependen del tipo celular y de la especie de la cual provienen las células (De Rooij,

2017b) . En el caso de la alpaca ha sido poco estudiada en el campo del cultivo de SSC y se ha logrado cultivar con éxito estas células por 21 días (Valdivia *et al.*, 2019b).

Durante los 8 días de cultivo *In vitro*, las SSC fueron monitoreadas y se evaluó la viabilidad en los cuatro grupos de tratamiento en los días 3 y 6 de cultivo, si bien no existe diferencia significativa entre tratamientos observamos que existe una tendencia con respecto al Grupo Gelatina que obtiene la media de los porcentajes de viabilidad menor con respecto al Grupo control para ambos días. Además, se observa que existe una disminución de los porcentajes de viabilidad conforme pasan los días con respecto a la viabilidad inicial (>90%), lo que se podría deber a que al cultivar las SSC, no solo cultivamos estas sino otras células somáticas producto del aislamiento, las cuales al no tener los requerimientos necesarios en el cultivo van muriendo (Freshney, 2010). Pero algunas SSC también pueden sufrir de apoptosis producto de que no llegan a adaptarse a las condiciones de cultivo ya que por ejemplo el tratamiento enzimático es un proceso que causa estrés en la célula debido a que la aísla de su estado natural y estas tienen que adaptarse a las nuevas condiciones, afectando así la viabilidad (Kim *et al.*, 2015), sin embargo, esto se da en un menor porcentaje. La reducción en la viabilidad también puede deberse a la acumulación de productos metabólicos y a la formación de ROS, lo que lleva a la apoptosis celular (Aliakbari *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2011)

Se ha observado también la formación de colonias de SSC en los distintos tratamientos, siendo muy notoria la mayor presencia de colonias en el Grupo DBA en el día 3 con respecto a los otros tratamientos, mientras que en el Grupo Control el mismo día no se ve colonias bien formadas aún e incluso se observa muchos otros tipos celulares, los primeros días. Sin embargo, en todos los tratamientos el día 6 del cultivo se observa la disminución de estas colonias con respecto a los primeros días. Estos resultados se asemejan a otros donde el día 7 de cultivo se da la desaparición

total de colonias de SSC de bovino, siendo los tratamientos con mayor presencia de colonias, DBA y poli – L – lisina (Kim *et al.*, 2014; Sahare *et al.*, 2015). Estas colonias se forman por la división de una célula madre espermatogonial por lo que cuando esta empieza a proliferar, las células que están en proceso de diferenciación se ubican en las zonas más periféricas de las colonias (Anway *et al.*, 2003; Izadyar *et al.*, 2003), esto se ha evidenciado por el reconocimiento de marcadores que indican SSC diferenciadas o SSC tipo A aligned como es el C-kit (Anjamrooz *et al.*, 2006; Mohamadi *et al.*, 2012). En nuestro caso se observa una menor intensidad del fluorocromo en las zonas marginales de la colonia lo que vendría a ser las células en vías de diferenciación (Figura 23).

La proliferación de las SSC dependerá de las mejoras en el sistema de cultivo que se puede dar por medio de distintos suplementos como BSA y SFB que ayudan en el mantenimiento de esta población por medio de la autorrenovación (Marret & Durand, 2000; Lee Y. *et al.*, 2013). El SFB permite la supervivencia y renovación de las células germinales, sin embargo, debido a que contiene otras sustancias indefinidas, puede desencadenar la diferenciación y otros efectos en las espermatogonias (Kubota *et al.*, 2004), por lo que el porcentaje de SSC no llega a ser tan alta y se opta por emplearlo en pequeñas cantidades, se ha visto que el 1% de suero en los medios mejora la tasa de renovación de SSC (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003). El suplemento de factores de crecimiento en el cultivo muestra un mayor soporte de la proliferación de SSC (Aponte *et al.*, 2008), en este trabajo se empleó suero de leche materna que presenta factores como GDNF, EGF e IGF (Eriksen *et al.*, 2018) y ha tenido buenos resultados en el cultivo *In vitro* de SSC de alpaca (Valdivia *et al.*, 2019b). Además, a esto se suma la presencia de células de Sertoli que no han sido del todo eliminadas luego del método del Percoll para el enriquecimiento, por lo que estas células también producen factores necesarios para la autorenovación de las SSC (Koruji *et al.*, 2009).

A los 8 días de cultivo la evaluación del porcentaje de células madre espermátogoniales por MF y CF mostró medias de $44.48 \pm 6.34\%$ y $52.6 \pm 23.44\%$ para el Grupo Control, mientras que el Grupo Percoll obtuvo medias de $52.38 \pm 5.64\%$ y $57.95 \pm 20.2\%$, estos resultados se asemejan a otro estudio en cultivos de SSC de alpaca donde han obtenido un porcentaje de 44.68% (sDBA) luego de 14 días de cultivo (sin enriquecimiento), mientras que el porcentaje con respecto a las células diferenciadas disminuye (Valdivia *et al.*, 2019b). Sin embargo, otro estudio muestra un porcentaje muy menor para las SSC post cultivo de 7.4% (Vasquez, 2018). En estos estudios los cultivos duran de 14 a 21 días y no se encuentra diferencia significativa en los porcentajes de las SSC, con respecto al tiempo de cultivo, por lo que a los ocho días nosotros encontramos iguales porcentajes. Existe un incremento en el porcentaje de SSC del Grupo Control con el Percoll, pero no es significativo ($p > 0.05$), esto se debería a que el mantenimiento de las SSC (porcentaje y viabilidad) es mayor en aquellos cultivos donde solo hay células germinales y no contaminación con células somáticas (Marret & Durand, 2000), ya que las células enriquecidas forman más rápido colonias (Kitamura *et al.*, 2018b) y suelen ser colonias más grandes (Han *et al.*, 2009), también observado en este trabajo (Figura 20 y 21).

El empleo de MEC en el cultivo permite asemejar las condiciones que tenían las células madre en el tejido, puesto que están estrechamente ligadas a su microambiente o nicho (Yoshida *et al.*, 2007) y es una de las razones por las que se dificulta su cultivo como células disociadas (Aponte y De Rooij, 2008). Por esta razón en este trabajo empleamos a la Gelatina como una MEC y evaluamos la influencia del DBA en las SSC. Al comparar los porcentajes obtenidos entre los cuatro Grupos de tratamiento de este estudio por MF y CF se observan diferencias en los porcentajes de SSC, siendo menor en el Grupo Control ($44.48 \pm 6.34\%$ y $52.6 \pm 23.44\%$) y mayor en el Grupo DBA ($63.28 \pm 5.61\%$ y $66.9 \pm 10.34\%$), el Grupo Percoll ($52.38 \pm 5.64\%$ y $57.95 \pm 20.2\%$) y Gelatina ($46.36 \pm 4.14\%$ y $53.05 \pm 17.73\%$)

obtuvieron porcentajes intermedios por ambas metodologías. Se observa que el orden creciente de los porcentajes de células madre espermatozonales es igual en ambas metodologías (MF y CF) y se presenta porcentajes semejantes entre estas para un mismo Grupo de tratamiento, sin embargo, solo se ha observado diferencia significativa en las muestras evaluadas por MF, siendo el Grupo DBA diferente a los demás tratamientos ($p < 0.05$) y por CF se observa diferencia numérica (Figura 24), mas no diferencia significativa ($p > 0.05$). Esta discrepancia se puede deber a la cantidad de células evaluadas por metodología (300 vs 10000), la mayor sensibilidad del citómetro al reconocer la mínima fluorescencia, además de que por CF se elimina el juicio subjetivo del operador al contar y evaluar la intensidad de fluorescencia y que a mayor tiempo la muestra este sometida a la luz se va perdiendo la intensidad del fluorocromo al ser evaluado por MF (Godfrey *et al.*, 2005), como se registran en estudios anteriores (Weston *et al.*, 1990; Hollville y Martin, 2016).

Los resultados observados a los 8 días de cultivo indican que existe un mayor porcentaje de SSC en las que fueron incubadas con DBA, indicando que el incremento de SSC puede ser estimulado por los residuos de unión a la lectina, ya que al existir esta interacción (DBA-GalNAc) puede generar cambios en la traducción de señales (Varki y Lowe, 2009). Esta interacción de lectina y ligando conlleva al crecimiento celular y proliferación, además el bloqueo de estos ligandos lleva a una disminución del crecimiento y formación de las colonias celulares (Kim *et al.*, 2014). Además, se ha visto que en las células madre embrionarias de ratón estos residuos estarían asociados con la transición a un estado pluripotente (Nash *et al.*, 2007). Se ha evaluado el DBA con otras lectinas en cultivo *In vitro* de células mesenquimales y se observó que el tratamiento con DBA inducía mayor producción de proteoglicanos produciendo mayor inducción de condrogénesis y osteogénesis en los cultivos (Talaie-Khozani *et al.*, 2011). En cultivos de SSC de bovino esta lectina ha mostrado que soporta mejor a proliferación de estas células, se observa mayor cantidad de

colonias formadas lo que sugiere que los ligandos de las moléculas de la superficie de estas células regularían características fisiológicas en el cultivo (Kim *et al.*, 2014) como la proliferación y mantenimiento.

Con respecto a la gelatina, ha sido usada para células musculares y endoteliales, pero también se ha empleada con células germinales (Sahare *et al.*, 2015). Se ha visto que el crecimiento y proliferación de las SSC puede ser soportado por la gelatina por el tiempo de una semana (Fujihara *et al.*, 2011), sin embargo, en otros estudios han presentado porcentaje menores aumentando la cantidad de células somáticas (Kim *et al.*, 2014), así como en este trabajo de investigación, donde el Grupo Gelatina presento el menor porcentaje de los tratamientos empleando MEC.

A diferencia del cultivo de SSC de ratón, en el caso de alpaca aún no se han llevado a cabo con éxito cultivos a largo plazo, por lo que estos resultados son prometedores e incentivan el utilizar estas matrices en cultivos de largo plazo, mayores a un mes. Y sus usos potenciales como obtener mejores tasas de recuperación post criopreservación de SSC y poder así mantener la diversidad genética de esta importante especie para el Perú.

7. CONCLUSIONES

- Las gradientes de densidad de Percoll permiten enriquecer la fracción de SSC de alpaca "*Vicugna pacos*", sin afectar su viabilidad y su capacidad de proliferar.
- El empleo de moléculas de matrices extracelulares si influye en el crecimiento de las SSC durante el cultivo, siendo la lectina DBA una molécula que puede soportar la proliferación de las SSC.

8. RECOMENDACIONES

- Complementar el método de enriquecimiento con Percoll con técnicas simples como plaqueo diferencial.
- Evaluar la dinámica poblacional de las células madre espermatogoniales durante el cultivo.
- Emplear otras moléculas de la matriz extracelular para el cultivo In vitro de las células madre espermatogoniales.
- Evaluar la proliferación de las células madre espermatogoniales por más tiempo de cultivo (cultivos a largo plazo).

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, Maria Celina, et al. Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2015, vol. 58, no 1, p. 10.
- AKHONDI, Mohammad Mehdi, et al. Propagation of human germ stem cells in long-term culture. *Iranian journal of reproductive medicine*, 2013, vol. 11, no 7, p. 551.
- ALIAKBARI, Fereshte, et al. Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. *Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")*, 2016, vol. 18, no 2, p. 87-95.
- ALOISIO, Gina M., et al. PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis. *The Journal of clinical investigation*, 2014, vol. 124, no 9, p. 3929-3944.
- AMANN, Rupert P. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?. *Journal of andrology*, 2008, vol. 29, no 5, p. 469-487.
- Amersham Biosciences AB, Handbook of Percoll 2001.
- ANJAM ROUZ S.H., MOVAHEDIN M., TIRAIHI T., MOULA SEYED JAVAD. Graft efficiency of co-cultured spermatogonial cells using sperm assay in epididymal lumen of recipient mice. *Cell Journal (Yakhteh)*, 2006, vol. 7, no 4, p. 242-249.
- ANWAY, Matthew D., et al. Isolation of Sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of Sertoli cell function. *Biology of Reproduction*, 2003, vol. 68, no 3, p. 996-1002.
- APONTE, Pedro M., et al. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reproduction*, 2008, vol. 136, no 5, p. 543-557.
- APONTE, P. M. *Spermatogonial stem cells in the bull*. 2009. Tesis Doctoral. UU Universiteit Utrecht.

- APONTE, Pedro Manuel. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World journal of stem cells*, 2015, vol. 7, no 4, p. 669.
- APONTE, P. M.; DE ROOIJ, D. G. Biomanipulation of bovine spermatogonial stem cells. *Animal Reproduction (AR)*, 2008, vol. 5, no 1, p. 16-22.
- AUGER, Jacques. Spermatogenic Cells Structure. En M. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*, (Second Edition) (53-60). Washington, USA: Elsevier. 2018.
- AVILÉS ESQUIVEL, D.F.; MONTERO, M.; BARROS-RODRÍGUEZ, M. Los camélidos sudamericanos: productos y subproductos usados en la región andina. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal AICA*, 2018, vol. 11, p. 30-38.
- AWANG-JUNAIDI, Awang Hazmi; HONARAMOOZ, Ali. Optimization of culture conditions for short-term maintenance, proliferation, and colony formation of porcine gonocytes. *Journal of animal science and biotechnology*, 2018, vol. 9, no 1, p. 8.
- BASIJI, David A., et al. Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. *Clinics in laboratory medicine*, 2007, vol. 27, no 3, p. 653-670.
- BEDFORD-GUAUS, S. J., et al. Molecular markers of putative spermatogonial stem cells in the domestic cat. *Reproduction in domestic animals*, 2017, vol. 52, p. 177-186.
- BELLAICHE, Johanna, et al. Spermatogonial stem cell quest: nanos2, marker of a subpopulation of undifferentiated A spermatogonia in trout testis. *Biology of Reproduction*, 2014, vol. 90, no 4, p. 79, 1-14.
- BELLVE, Anthony R., et al. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: isolation and morphological characterization. *The Journal of cell biology*, 1977, vol. 74, no 1, p. 68-85.

- BRAVO, P. W., et al. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 1997, vol. 47, no 3, p. 619-626.
- BRAVO, P. W., et al. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Archives of andrology*, 1999, vol. 43, no 3, p. 239-246.
- BRAVO, P. W.; SKIDMORE, J. A.; ZHAO, X. X. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science*, 2000, vol. 62, no 1-3, p. 173-193.
- BRAVO, P. Walter, et al. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Animal reproduction science*, 2013, vol. 136, no 3, p. 157-163.
- BRINSTER, Ralph L. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*, 2002, vol. 296, no 5576, p. 2174-2176.
- BRINSTER, Ralph L. Male germline stem cells: from mice to men. *Science*, 2007, vol. 316, no 5823, p. 404-405.
- BRINSTER, Ralph L.; AVARBOCK, Mary R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, vol. 91, no 24, p. 11303-11307.
- BUCCI, Luke R., et al. Isolation and biochemical studies of enriched populations of spermatogonia and early primary spermatocytes from rat testes. *Biology of reproduction*, 1986, vol. 34, no 1, p. 195-206.
- CANORIO, Nadia. Efecto del proceso de criopreservación sobre las proteínas antioxidantes GPX1 Y GPX4 de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). 2015.
- CARLOMAGNO, Gianfranco, et al. BMP4-induced differentiation of a rat spermatogonial stem cell line causes changes in its cell adhesion properties. *Biology of reproduction*, 2010, vol. 83, no 5, p. 742-749.

- CENAGRO, I. V. IV Censo Nacional Agropecuario. *Resultados finales. INEI Lima Perú*, 2012.
- CHAI, Chou; LEONG, Kam W. Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. *Molecular therapy*, 2007, vol. 15, no 3, p. 467-480.
- COSTA, Guilherme MJ, et al. Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. *PloS one*, 2012, vol. 7, no 8.
- CREEMERS, L. B., et al. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 2002, vol. 124, no 6, p. 791-799.
- CRISPÍN CUNYA, Marianella. Productividad y distribución de fibra de alpaca en la región de Huancavelica: un análisis comparativo entre Huancavelica y Puno. 2008.
- CRUZ, A., et al. Genetic parameters estimation for preweaning traits and their relationship with reproductive, productive and morphological traits in alpaca. *Animal*, 2017, vol. 11, no 5, p. 746-754.
- DADOUNE, Jean-Pierre. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2007, vol. 45, no 3, p. 141-147.
- DE LAMO, Daniel A. Camélidos sudamericanos: Historia, usos y sanidad animal. *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*. Buenos Aires, 2011.
- DE ROOIJ, Dirk G. Stem cells in the testis. *International journal of experimental pathology*, 1998, vol. 79, no 2, p. 67-80.
- DE ROOIJ, Dirk G. The spermatogonial stem cell niche in mammals. En *Sertoli Cell Biology*. Academic Press, 2015. p. 99-121.
- DE ROOIJ, Dirk G. Organization of the seminiferous epithelium and the cycle, and morphometric description of spermatogonial subtypes (rodents and

primates). En *The Biology of mammalian spermatogonia*. Springer, New York, NY, 2017a. p. 3-20.

- DE ROOIJ, Dirk G. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development*, 2017b, vol. 144, no 17, p. 3022-3030.
- DE ROOIJ, DIRK G.; RUSSELL, LONNIE D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology*, 2000, vol. 21, no 6, p. 776-798.
- DE ROOIJ, Dirk G.; REPPING, S.; VAN PELT, Ans MM. Role for adhesion molecules in the spermatogonial stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 2008, vol. 3, no 5, p. 467-468.
- DOBRINSKI, Ina. Advances and applications of germ cell transplantation. *Human Fertility*, 2006, vol. 9, no 1, p. 9-14.
- EHMCKE, Jens; WISTUBA, Joachim; SCHLATT, Stefan. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Human reproduction update*, 2006, vol. 12, no 3, p. 275-282.
- EILDERMANN, K., et al. Developmental expression of the pluripotency factor sal-like protein 4 in the monkey, human and mouse testis: restriction to premeiotic germ cells. *Cells Tissues Organs*, 2012, vol. 196, no 3, p. 206-220.
- EL OUALI, H., et al. Laminin ultrastructural immunolocalization in rat testis during ontogenesis. *Histochemistry*, 1991, vol. 95, no 3, p. 241-246.
- ELZAWAM, Aymen Z. Establishment of spermatogenesis following testicular tissue ectopic xenografting in alpaca. 2013.
- ERAZO ROMERO, Saulo, et al. *Aislamiento, cultivo e identificación molecular de células madre espermatogoniales en bovinos*. 2017. Tesis de Licenciatura. Quito.
- ERIKSEN, Kamilla G., et al. Human milk composition and infant growth. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 2018, vol. 21, no 3, p. 200-206.

- EVANGELISTA-VARGAS, D., et al. Assessment of spermatozoa in fertile alpaca (*Vicugna pacos*) males: Study of sperm head morphometry using a nonautomated digital method and sperm morphology based on strict criteria. *Reproduction in domestic animals*, 2017, vol. 52, no 2, p. 312-318.
- FERNÁNDEZ BACA, Saúl. *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. 1991.
- FERNÁNDEZ BACA, S. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. *Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*, 2005.
- FRANTZ, Christian; STEWART, Kathleen M.; WEAVER, Valerie M. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*, 2010, vol. 123, no 24, p. 4195-4200.
- FRESHNEY, R. I.; *Culture of animal cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Application*, 6th edition; John Wiley and Sons: New Jersey, 2010, p. 163-186.
- FUCHS, Elaine; TUMBAR, Tudorita; GUASCH, Geraldine. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 2004, vol. 116, no 6, p. 769-778.
- FUJIHARA, Mayako, et al. Characterization and in vitro culture of male germ cells from developing bovine testis. *Journal of Reproduction and Development*, 2011, p. 1101260348-1101260348.
- GALLOWAY, D. B. The development of the testicles in alpacas in Australia. *Australian Alpaca Association. Canberra*, 2000, p. 21-3.
- GALUPPO, Andrea Giannotti. Spermatogonial stem cells as a therapeutic alternative for fertility preservation of prepubertal boys. *Einstein (Sao Paulo)*, 2015, vol. 13, no 4, p. 637-639.

- GAT, Itai, et al. Optimal culture conditions are critical for efficient expansion of human testicular somatic and germ cells in vitro. *Fertility and sterility*, 2017, vol. 107, no 3, p. 595-605. e7.
- GIULIANO, S. Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericanos. *Spermova*, 2012, vol. 2, no 1, p. 6-9.
- GLATTAUER, Veronica, et al. Examination of basement membrane components associated with the bovine seminiferous tubule basal lamina. *Reproduction, Fertility and Development*, 2007, vol. 19, no 3, p. 473-481.
- GODFREY, W. L., et al. Complementarity of flow cytometry and fluorescence microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 2005, vol. 11, no S02, p. 246-247.
- GOEL, Sandeep, et al. Identification, isolation, and in vitro culture of porcine gonocytes. *Biology of Reproduction*, 2007, vol. 77, no 1, p. 127-137.
- GONZÁLEZ, Raquel; TANG, Lin; DOBRINSKI, Ina. Application of Spermatogonial Transplantation in Agricultural Animals. En *The Biology of Mammalian Spermatogonia*. Springer, New York, NY, 2017. p. 343-377.
- GUO, Qing Yun, et al. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), ALK5, and claudin-11 in adult alpaca testis. *Acta histochemica*, 2013, vol. 115, no 1, p. 16-21.
- HACK, W. The Peruvian alpaca meat and hide industries. *Rural Industries Research and Development Corporation*, 2001, vol. 1, no 19, p. 11.
- HAMIDABADI, Hatef Ghasemi; BOJNORDI, Maryam Nazm. Co-culture of mouse spermatogonial stem cells with sertoli cell as a feeder layer, stimulates the proliferation and spermatogonial stemness profile. *Middle East Fertility Society Journal*, 2018, vol. 23, no 2, p. 107-111.
- HAMRA, F. Kent, et al. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no 48, p. 17430-17435.

- HAN, Su Young, et al. Isolation and in vitro culture of pig spermatogonial stem cell. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2009, vol. 22, no 2, p. 187-193.
- HE, Junping, et al. Localization of epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) during postnatal testis development in the alpaca (*Lama pacos*). *Animal reproduction science*, 2009, vol. 116, no 1-2, p. 155-161
- HE, Zuping, et al. Gfra1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biology of reproduction*, 2007, vol. 77, no 4, p. 723-733.
- HEIDARI, Banafsheh, et al. Enrichment of undifferentiated type A spermatogonia from goat testis using discontinuous percoll density gradient and differential plating. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 2014, vol. 6, no 2, p. 94.
- HERRID, Muren; DAVEY, Rhonda J.; HILL, Jonathan R. Characterization of germ cells from pre-pubertal bull calves in preparation for germ cell transplantation. *Cell and Tissue Research*, 2007, vol. 330, no 2, p. 321-329.
- HERRID, Muren, et al. A comparison of methods for preparing enriched populations of bovine spermatogonia. *Reproduction, Fertility and Development*, 2009, vol. 21, no 3, p. 393-399.
- HOFMANN, Marie-Claude. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and cellular endocrinology*, 2008, vol. 288, no 1-2, p. 95-103.
- HOLLVILLE, Emilie; MARTIN, Seamus J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Current protocols in immunology*, 2016, vol. 112, no 1, p. 14.38. 1-14.38. 24.
- HRUBEC, Terry C.; ROBINSON, J. Michael; DONALDSON, Robert P. Isolation of mitochondria from soybean leaves on discontinuous Percoll gradients. *Plant physiology*, 1985, vol. 77, no 4, p. 1010-1012.

- HU, J., et al. Vitamin C enhances the in vitro development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. *Reproduction in domestic animals*, 2012, vol. 47, no 6, p. 873-879.
- HUAMANÍ ALVARADO, Jackeline. Determinación de viabilidad y rendimiento durante el aislamiento de espermatogonias de *Vicugna pacos* “alpaca” a diferentes edades. 2018.
- HUANCA, Teodosio, et al. Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos*). 2012.
- IZADYAR, F., et al. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 2002, vol. 124, no 1, p. 85-94.
- IZADYAR, Fariborz, et al. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biology of reproduction*, 2003, vol. 68, no 1, p. 272-281.
- JAFARNEJAD, A., et al. Optimization of in vitro culture and transfection condition of bovine primary spermatogonial stem cells. *South African Journal of Animal Science*, 2018, vol. 48, no 1, p. 108-116.
- JONES, Richard E.; LOPEZ, Kristin H. *Human reproductive biology*. Academic Press, 2013.
- JUYENA, N. S., et al. Alpaca semen quality in relation to different diets. *Reproduction, Fertility and Development*, 2013, vol. 25, no 4, p. 683-690.
- KANATSU-SHINOHARA, Mito, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of reproduction*, 2003, vol. 69, no 2, p. 612-616.
- KANATSU-SHINOHARA, Mito, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biology of reproduction*, 2005, vol. 72, no 4, p. 985-991.

- KANATSU-SHINOHARA, Mito, et al. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biology of reproduction*, 2008, vol. 78, no 4, p. 611-617.
- KANATSU-SHINOHARA, Mito, et al. Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no 8.
- KIM, Ki-Jung, et al. Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing. *Cryobiology*, 2015, vol. 70, no 2, p. 175-183.
- KIM, Sung-Min, et al. Effects of extracellular matrices and lectin *Dolichos biflorus* agglutinin on cell adhesion and self-renewal of bovine gonocytes cultured in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 2014, vol. 26, no 2, p. 268-281.
- KORUJI, Morteza, et al. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2009, vol. 45, no 5-6, p. 281.
- KITAMURA, Y., et al. 192 Culture Conditions Supporting Long-Term Expansion of Bovine Spermatogonial Stem Cells Isolated from Adult and Immature Testes. *Reproduction, Fertility and Development*, 2018a, vol. 30, no 1, p. 236-236.
- KITAMURA, Yuka, et al. Long-term culture of undifferentiated spermatogonia isolated from immature and adult bovine testes. *Molecular reproduction and development*, 2018b, vol. 85, no 3, p. 236-249.
- KORUJI, Morteza, et al. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2009, vol. 45, no 5-6, p. 281.
- KUBOTA, Hiroshi; AVARBOCK, Mary R.; BRINSTER, Ralph L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem

cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, vol. 101, no 47, p. 16489-16494.

- KUBOTA, Hiroshi; BRINSTER, Ralph L. Spermatogonial stem cells. *Biology of reproduction*, 2018, vol. 99, no 1, p. 52-74.
- KULAR, Jaspreet K.; BASU, Shouvik; SHARMA, Ram I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of tissue engineering*, 2014, vol. 5, p. 2041731414557112.
- KUSHKI, Davoud; AZARNIA, Mahnaz; GHOLAMI, Mohammadreza. Antioxidant effects of selenium on seminiferous tubules of immature mice testis. 2015.
- LA MANNA, Vincenzo, et al. Analysis of genetic distance between Peruvian Alpaca (*Vicugna pacos*) showing two distinct fleece phenotypes, Suri and Huacaya, by means of microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science*, 2011, vol. 10, no 4, p. e60.
- LANGENSTROTH, Daniel, et al. Separation of somatic and germ cells is required to establish primate spermatogonial cultures. *Human Reproduction*, 2014, vol. 29, no 9, p. 2018-2031.
- LAURENT, Torvard C., et al. Physical chemical characterization of Percoll. II. Size and interaction of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1980, vol. 76, no 1, p. 133-141.
- LEE, Won-Young, et al. Establishment and in vitro culture of porcine spermatogonial germ cells in low temperature culture conditions. *Stem Cell Research*, 2013, vol. 11, no 3, p. 1234-1249.
- LEE, Yong-An, et al. Cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells in dimethylsulfoxide and polyethylene glycol. *Biology of reproduction*, 2013, vol. 89, no 5, p. 109, 1-9.

- LIU, Shixue, et al. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2011, vol. 9, no 1, p. 141.
- LORD, Tessa; OATLEY, Jon M. Regulation of spermatogonial stem cell maintenance and self-renewal. En *The Biology of Mammalian Spermatogonia*. Springer, New York, NY, 2017. p. 91-129.
- LUO, Jinping, et al. Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: Application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. *Molecular reproduction and development*, 2006, vol. 73, no 12, p. 1531-1540.
- MADRID, Juan F., et al. Lectin cytochemical characterization of the N-and O-linked oligosaccharides in the human rectum. *The Histochemical Journal*, 2000, vol. 32, no 5, p. 281-289.
- MARDANPOUR, Parisa, et al. Potency of germ cells and its relevance for regenerative medicine. *Journal of anatomy*, 2008, vol. 213, no 1, p. 26-29.
- MARIN, Juan C., et al. Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista chilena de historia natural*, 2007, vol. 80, no 2, p. 121-140.
- MARRET, Cécile; DURAND, Philippe. Culture of porcine spermatogonia: effects of purification of the germ cells, extracellular matrix and fetal calf serum on their survival and multiplication. *Reproduction Nutrition Development*, 2000, vol. 40, no 3, p. 305-319.
- MAYHUA, P., et al. Differences in fibre diameter profile between shearing periods in white Huacaya Alpacas (*Vicugna pacos*). En *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2011. p. 59-64.

- MCGREGOR, B. A. Production, attributes and relative value of alpaca fleeces in southern Australia and implications for industry development. *Small Ruminant Research*, 2006, vol. 61, no 2-3, p. 93-111.
- MCLAREN, Anne. Genetics and human reproduction. *Trends in Genetics*, 1998, vol. 14, no 10, p. 427-431.
- MENDOZA, MAYRA NOHELIA, et al. Chromosomal localization of candidate genes for fiber growth and color in alpaca (*Vicugna pacos*). *Frontiers in genetics*, 2019, vol. 10, p. 583.
- MIAO, Xiang-Yang. Production of transgenic animals using spermatogonial stem cells. *Agricultural Sciences in China*, 2011, vol. 10, no 5, p. 762-768.
- MIRZAPOUR, T., et al. Evaluation of the effects of cryopreservation on viability, proliferation and colony formation of human spermatogonial stem cells in vitro culture. *Andrologia*, 2013, vol. 45, no 1, p. 26-34.
- MOHAMADI, S. M., et al. Comparison of colony formation in adult mouse spermatogonial stem cells developed in Sertoli and STO coculture systems. *Andrologia*, 2012, vol. 44, p. 431-437.
- MOHAQIQ, Mahdi, et al. Investigation on the effect of low intensity ultrasound stimulation on mouse spermatogonial stem cell proliferation and colonization. *Anatomical Sciences Journal*, 2013, vol. 10, no 3, p. 119-124.
- MONTES, M., et al. Quality characteristics of Huacaya alpaca fibre produced in the Peruvian Andean Plateau region of Huancavelica. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2008, no 1, p. 33-38.
- MORANTE, R., et al. Genetic improvement for alpaca fibre production in the Peruvian Altiplano: the Pacamarca experience. *Animal Genetic Resources/Recursos génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 2009, vol. 45, p. 37-43.

- MORANTE, R.; BURGOS, A.; GUTIÉRREZ, J. P. Producing alpaca fibre for the textile industry. En *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2011. p. 35-40.
- MOREIRA DA SILVA, F.; MARQUES, A.; CHAVEIRO, A. Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction. *The Open Veterinary Science Journal*, 2010, vol. 4, no 1.
- MORENO RUIZ, Pablo. Interacciones entre las células madre pluripotentes del Carcinoma Embrionario y las Células Miodes Peritubulares del Testículo. 2015.
- MUJICA LENGUA, Fidel Rodolfo. Caracterización de células germinales testiculares de *Vicugna pacos* (alpaca) y expresión de biomarcadores específicos en tejido gonadal. 2018.
- MULDER, Callista L., et al. Spermatogonial stem cell autotransplantation and germline genomic editing: a future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. *Human reproduction update*, 2016, vol. 22, Bno 5, p. 561-573.
- NAGANO, Makoto, et al. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue and Cell*, 1998, vol. 30, no 4, p. 389-397.
- NASH, Rodney, et al. The lectin *Dolichos biflorus* agglutinin recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells*, 2007, vol. 25, no 4, p. 974-982.
- NAUGHTON, Cathy K., et al. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biology of reproduction*, 2006, vol. 74, no 2, p. 314-321.
- NING, Liang, et al. Spermatogonial stem cells as a source for regenerative medicine. *Middle East Fertility Society Journal*, 2012, vol. 17, no 1, p. 1-7.

- OATLEY, Jon M.; BRINSTER, Ralph L. Spermatogonial stem cells. En *Methods in enzymology*. Academic Press, 2006. p. 259-282.
- OATLEY, Jon M.; BRINSTER, Ralph L. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiological reviews*, 2012, vol. 92, no 2, p. 577-595.
- OATLEY, Jon M.; REEVES, Jerry J.; MCLEAN, Derek J. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. *Biology of reproduction*, 2004, vol. 71, no 3, p. 942-947.
- OHTA, Hiroshi, et al. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development*, 2000, vol. 127, no 10, p. 2125-2131.
- ORWIG, Kyle E., et al. Male germ-line stem cell potential is predicted by morphology of cells in neonatal rat testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no 18, p. 11706-11711.
- PACHECO CURIE, Joel Iván. Métodos de coleccion de semen en camélidos sudamericanos-Methods of semen collection in south american camelids. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria*, 2008, vol. 1695, p. 7504.
- PARK, Min Hee, et al. Development of a high-yield technique to isolate spermatogonial stem cells from porcine testes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2014, vol. 31, no 8, p. 983-991.
- PARK, Min Hee, et al. Integrin heterodimers expressed on the surface of porcine spermatogonial stem cells. *DNA and cell biology*, 2018, vol. 37, no 3, p. 253-263.
- PAUCAR-CHANCA, Rufino, et al. Textile characteristics of fiber from Huacaya alpacas (*Vicugna pacos*). *Scientia Agropecuaria*, 2019, vol. 10, no 3, p. 429-432.
- PEARSON; LK; RODRIGUEZ, JS; TIBARY A. Chapter 19 - Infertility and Subfertility in the Male, In: Cebra, C., Anderson, D.E., Tibary, A., Saun, R.J.V., Johnson, L.W. (Eds.), *Llama and Alpaca Care*, W.B. Saunders, St. Louis. 2014; 194-216.

- PERTOFT, Håkan, et al. The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll (TM). *Experimental cell research*, 1977, vol. 110, no 2, p. 449-457.
- PHILLIPS, Bart T.; GASSEI, Kathrin; ORWIG, Kyle E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010, vol. 365, no 1546, p. 1663-1678.
- PILLER, Veronique; PILLER, Friedrich; CARTRON, Jean-Pierre. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins. *European journal of biochemistry*, 1990, vol. 191, no 2, p. 461-466.
- QUISPE, E. C. Mejoramiento genético y medioambiental de alpacas en la región de Huancavelica. *Proyecto de Inversión Pública a nivel de Perfil*, 2005.
- QUISPE, E. C., et al. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources*, 2009, vol. 45, p. 1-14.
- QUISPE PEÑA, Edgar; POMA GUTIÉRREZ, Adolfo; PURROY UNANUA, Antonio. CARACTERISTICAS PRODUCTIVAS Y TEXTILES DE LA FIBRA DE ALPACAS DE RAZA HUACAYA A REVIEW OF HUACAYA ALPACAS FIBER TRAITS. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2013, vol. 7, no 1, p. 1-29.
- RATTO, Marcelo, et al. Effect of location and stage of development of dominant follicle on ovulation and embryo survival rate in alpacas. *Animal reproduction science*, 2011, vol. 127, no 1-2, p. 100-105.
- RIBOLDI, Marcia. Aislamiento, cultivo, caracterización y maduración de células indiferenciadas desde biopsias testiculares humanas. 2013.
- RICKWOOD, D. Choice of media for centrifugal separations. *Centrifugation: a practical approach*, 1978, p. 22.

- RODRIGUEZ-SOSA, Jose Rafael; DOBSON, Howard; HAHNEL, Ann. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology*, 2006, vol. 66, no 9, p. 2091-2103.
- ROSER, Janet F. Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science*, 2008, vol. 107, no 3-4, p. 179-196.
- RYU, Buom-Yong, et al. Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. *Developmental biology*, 2004, vol. 274, no 1, p. 158-170.
- SAHARE, Mahesh, et al. Factors supporting long-term culture of bovine male germ cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 2016, vol. 28, no 12, p. 2039-2050.
- SAHARE, Mahesh G.; IMAI, Hiroshi. Recent advances of in vitro culture systems for spermatogonial stem cells in mammals. *Reproductive medicine and biology*, 2018, vol. 17, no 2, p. 134-142.
- SANTIANI, Alexei, et al. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian journal of Andrology*, 2005, vol. 7, no 3, p. 303-309.
- SCHNEIDER, Florian, et al. Comparison of enzymatic digestion and mechanical dissociation of human testicular tissues. *Fertility and sterility*, 2015, vol. 104, no 2, p. 302-311. e3.
- SCHWALM, A., et al. Influence of heat stress on thermoregulation and fertility in shorn and unshorn male llamas (*Lama glama*). *TIERAERZTLICHE PRAXIS AUSGABE GROSSTIERE NUTZTIERE*, 2008, vol. 36, no 5, p. 324-328.
- SHAMS, Azar, et al. Future of spermatogonial stem cell culture: application of nanofiber scaffolds. *Current stem cell research & therapy*, 2017, vol. 12, no 7, p. 544-553.

- SHINOHARA, Takashi; AVARBOCK, Mary R.; BRINSTER, Ralph L. β 1-and α 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, vol. 96, no 10, p. 5504-5509.
- SMITH, C. L.; PETER, A. T.; PUGH, D. G. Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology*, 1994, vol. 41, no 3, p. 573-592.
- SPRADLING, Allan, et al. Germline stem cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2011, vol. 3, no 11, p. a002642.
- STELLETTA, C., et al. Testicular cytology of alpaca: comparison between impressed and smeared slides. *Animal reproduction science*, 2011, vol. 125, no 1-4, p. 133-137.
- STOCKERT, Juan Carlos; BLÁZQUEZ-CASTRO, Alfonso. *Fluorescence Microscopy in Life Sciences*. Bentham Science Publishers, 2017.
- STROBER, Warren. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 2015, vol. 111, no 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3.
- SUMAR, Julio. *Studies on reproductive pathology in alpacas*. 1983.
- SUMAR, Julio. Defectos congénitos y hereditarios en la alpaca. *Teratología. Cusco: CONCYTEC*, 1989.
- SUMAR, J. Contribution of the radioimmunoassay technique to knowledge of the reproductive physiology of South American camelids. *Isotope and related techniques in animal production and health*. 1991.
- TAKASHIMA, Seiji; SHINOHARA, Takashi. Culture and transplantation of spermatogonial stem cells. *Stem cell research*, 2018, vol. 29, p. 46-55.
- TALAEI-KHOZANI, Tahereh; MONSEFI, Malihezaman; GHASEMI, Mansoureh. Lectins influence chondrogenesis and osteogenesis in limb bud mesenchymal cells. *Glycoconjugate journal*, 2011, vol. 28, no 2, p. 89-98.
- THEOCHARIS, Achilleas D., et al. Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*, 2016, vol. 97, p. 4-27.

- TIBARY, A.; RUIZ, A. Investigation of male infertility in llamas and alpacas. *SPERMOVA*. 2018, vol. 8, no 3, p. 33-48.
- TIBARY, A.; VAUGHAN, J. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: a review and clinical observations. *Small Ruminant Research*, 2006, vol. 61, no 2-3, p. 283-298.
- URQUIETA, Bessie, et al. Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a mating period. *Animal reproduction science*, 2005, vol. 90, no 3-4, p. 329-339.
- VALDIVIA, Martha, et al. Spermatogonial stem cells identified by molecular expression of PLZF, integrin $\beta 1$ and reactivity to *Dolichos biflorus* agglutinin in alpaca adult testes. *Andrologia*, 2019a, vol. 51, no 6, p. e13283.
- VALDIVIA, Martha, et al. In vitro culture of spermatogonial stem cells isolated from adult alpaca (*Vicugna pacos*) testes analysed with *2.4. biflorus* by flow cytometry. *Andrologia*, 2019b, vol. 51, no 6, p. e13269.
- VALDIVIA CUYA, Martha Esther. Efecto de la suplementación de maca roja o negra atomizada comercial combinada con un potencial crioprotector para células madre espermatogoniales (SSC) de alpaca *Vicugna pacos* tanto en SSC aisladas como en fragmentos testiculares. 2019.
- NA, Ans MM, et al. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biology of Reproduction*, 1996, vol. 55, no 2, p. 439-444.
- VAN SAUN, Robert John. Effect of nutrition on reproduction in llamas and alpacas. *Theriogenology*, 2008, vol. 70, no 3, p. 508-514.
- VANSANDT, Lindsey M., et al. Conservation of spermatogonial stem cell marker expression in undifferentiated felid spermatogonia. *Theriogenology*, 2016, vol. 86, no 4, p. 1022-1035. e3.

- VARKI, Ajit; LOWE, John B. Biological roles of glycans. En *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- VASQUEZ, Jhakelin. Proliferación de células madre espermato goniales (SSC) de alpaca (*Vicugna pacos*) y su posterior criopreservación. 2018.
- VON KOPYLOW, Kathrein, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 is highly expressed in rarely dividing human type A spermatogonia. *Histochemistry and cell biology*, 2012, vol. 138, no 5, p. 759-772.
- WATT, Fiona M.; HUCK, Wilhelm TS. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2013, vol. 14, no 8, p. 467-473.
- WANG, Juhua, et al. Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells in vitro. *Theriogenology*, 2014, vol. 81, no 4, p. 545-555.
- WANG, Xiaoyan, et al. Isolation and culture of pig spermatogonial stem cells and their in vitro differentiation into neuron-like cells and adipocytes. *International journal of molecular sciences*, 2015, vol. 16, no 11, p. 26333-26346.
- WESTON, Susan A.; PARISH, Christopher R. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies: analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *Journal of immunological methods*, 1990, vol. 133, no 1, p. 87-97.
- WHEELER, Jane C., et al. Origen, evolución y status actual. *Avances y perspectivas en el conocimiento de los camélidos sudamericanos*, 1991, p. 11-48.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
- WU, Hong, et al. Isolation, purification and culture of spermatogonia in chicken. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2006, vol. 37, no 11, p. 1173.

- XU, Yong, et al. 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSC s injected into ischemic kidney. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2016, vol. 20, no 7, p. 1203-1213.
- YACOBACCIO, Hugo D.; VILÁ, Bibiana. La domesticación de los camélidos andinos como proceso de interacción humana y animal. 2017.
- YAN, Z.; SUN, X.; ENGELHARDT, J. F. Progress and prospects: techniques for site-directed mutagenesis in animal models. *Gene therapy*, 2009, vol. 16, no 5, p. 581-588.
- YANG, Yanfei; HONARAMOOZ, Ali. Efficient purification of neonatal porcine gonocytes with Nycodenz and differential plating. *Reproduction, Fertility and Development*, 2011, vol. 23, no 3, p. 496-505.
- YOSHIDA, Shosei; SUKENO, Mamiko; NABESHIMA, Yo-ichi. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*, 2007, vol. 317, no 5845, p. 1722-1726.
- YUCRA CANO, Luz Eleana. Sistema de comercialización y situación sociocultural, económica y ambiental de la cadena de producción de la fibra de alpaca en el distrito de Macusani, provincia de Carabaya, Puno. 2017.
- ZHANG, Rui; SUN, Jin; ZOU, Kang. Advances in isolation methods for spermatogonial stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2016, vol. 12, no 1, p. 15-25.
- ZHENG, Yi, et al. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*, 2014, vol. 147, no 3, p. R65-R74.

10. ANEXOS

Anexo N° 1. Camal Municipal de la ciudad de Huancavelica,
Callqui Chico.



Anexo N° 2. Llegada de las muestras biológicas al Laboratorio de Fisiología de la
Reproducción – UNMSM y pesaje de las muestras biológicas.



Anexo N° 3. Aislamiento de células a partir de testículos de alpaca "*Vicugna pacos*"



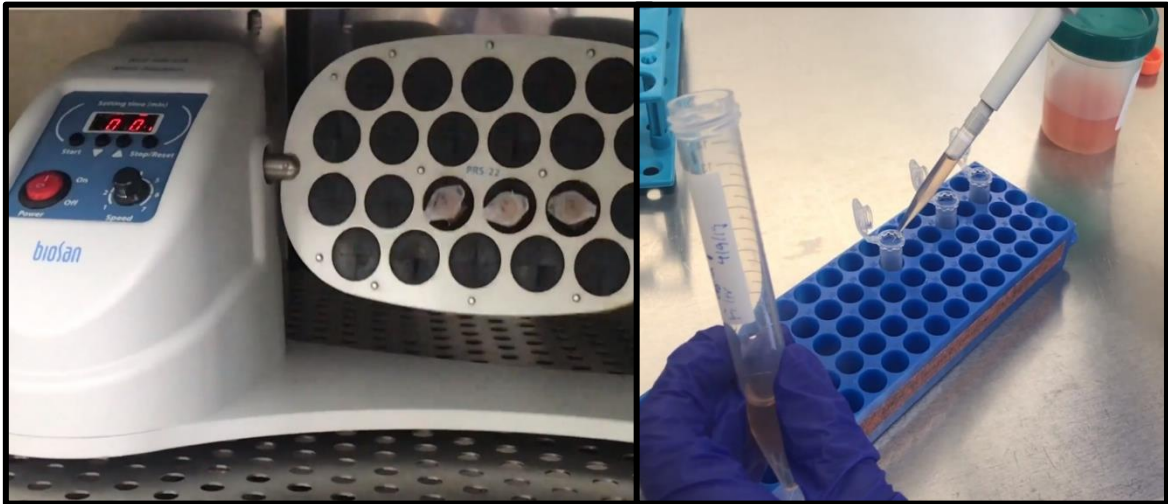
1. Obtención de biopsias testiculares, luego del retiro de la túnica albugínea y

2. Se empieza a moler el tejido para la liberación de células



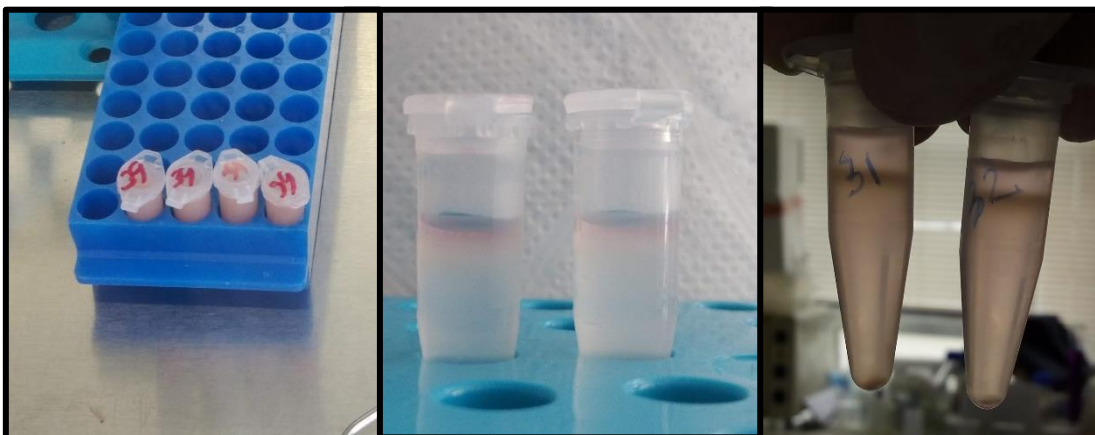
3. Se recolecta la suspensión celular obtenida.

4. Centrifugación de suspensiones celulares.



1. Digestiones enzimáticas en agitación constante.

2. Lavados de las suspensiones celulares

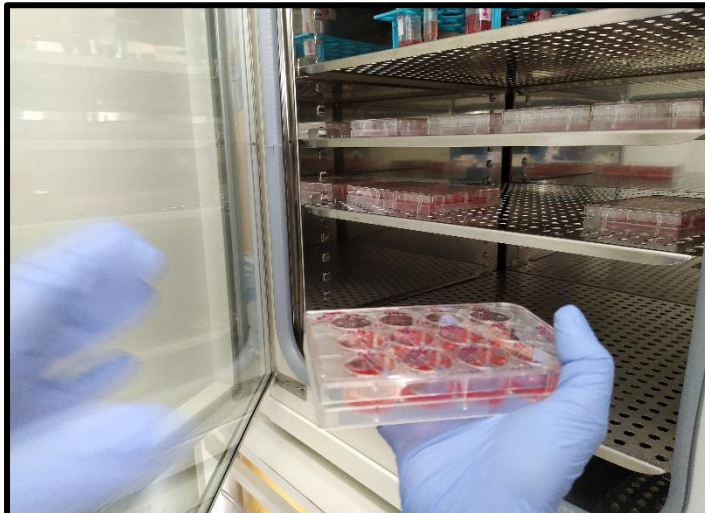


3. Suspensión de células aisladas incluyendo SSC.

4. Enriquecimiento en columnas de Percoll.

5. Obtención de células aisladas principalmente SSC.

Anexo N° 4. Cultivo y monitoreo de Células Madre Espermatogoniales.



Se tomaron fotografías de los cultivos cada tres días y se evaluaba el crecimiento de las SSC.



Anexo N° 5. Parámetros espermáticos de las muestras empleadas de alpaca "Vicugna pacos"

<i>MUESTRA</i>	<i>PROMEDIO PESO TESTICULAR</i>	<i>CONCENTRACIÓN SPZ (millones/mL)</i>	<i>VIABILIDAD ESPERMÁTICA</i>			<i>MOVILIDAD ESPERMÁTICA</i>		
			<i>V</i>	<i>M</i>	<i>%</i>	<i>%MP</i>	<i>%NP</i>	<i>%I</i>
<i>1</i>	8.12	24.8	170	74	69.67	31.7	18.55	49.75
<i>2</i>	15.61	66	147	25	85.47	35.16	22.75	42.09
<i>3</i>	14.96	381	103	40	72.03	29.81	28.1	42.09
<i>4</i>	13.96	163	102	82	55.43	36.63	28.29	35.08
<i>5</i>	12.66	40	108	26	80.6	14.46	24.79	60.75
<i>6</i>	13.29	322	60	25	70.59	41.8	15.28	42.92
<i>7</i>	13.33	217	102	36	73.91	35.99	21.52	42.49
<i>8</i>	14.1	619	130	66	66.33	18.06	23.37	58.57
<i>9</i>	16.45	83	339	172	66.34	34.31	14.84	50.85
<i>10</i>	14.29	92	110	197	35.83	25.37	13.15	61.48
<i>11</i>	14.89	120	193	106	64.55	41.65	16.89	41.47
<i>12</i>	18.67	265	130	43	75.14	ND	ND	ND
<i>PROMEDIO</i>	14.19	199.40	-	-	67.99	31.36	20.68	47.96
<i>± SD</i>	2.51	174.54	-	-	12.74	8.88	5.30	8.96

SPZ: Espermatozoides.

%MP: Porcentaje de movilidad progresiva.

%NP: Porcentaje de movilidad no progresiva.

%I: Porcentaje de inmóviles.

V: Vivos.

M: Muertos.

ND: No determinado.

SD: Desviación estándar

Anexo N° 6. Concentración celular y viabilidad celular de las muestras de pre Percoll y Post Percoll.

MUESTRA	PRE PERCOLL				POST PERCOLL			
	CONCENTRACIÓN CELULAR (millones/mL)	VIABILIDAD CELULAR			CONCENTRACIÓN CELULAR (millones/mL)	VIABILIDAD CELULAR		
		V	M	%		V	M	%
1	94	195	20	90.7	29.3	209	20	91.3
2	40	70	2	97.2	1.1	236	5	97.9
3	82	252	3	98.8	19.3	449	28	94.1
4	116	258	1	99.6	28.3	492	27	94.8
5	143	414	7	98.3	25.2	747	54	93.3
6	60	379	20	95	11.8	322	25	92.8
7	111	281	5	98.3	12	68	26	72.3
8	95	283	5	98.3	9.8	246	31	88.8
9	88	192	63	75.3	10.7	143	17	89.4
10	130	86	7	92.5	6.1	221	23	90.6
11	94	159	6	96.4	3.7	167	6	96.5
12	26.1	290	5	98.3	24.6	483	30	94.2
PROMEDIO	89.93	-	-	94.89	15.16	-	-	91.33
±SD	34.55	-	-	6.73	9.82	-	-	6.58

V: Vivos.

M: Muertos.

SD: Desviación estándar.

Anexo N° 7. Porcentajes de las tres poblaciones caracterizadas por DBA-FITC antes y después del enriquecimiento con Percoll evaluadas por Microscopía de Fluorescencia.

NUEVO RÓTULO	Pre Percoll			Post Percoll		
	sDBA+	wDBA+	DBA-	sDBA+	wDBA+	DBA-
1	14.90	45.10	40.00	35.17	20.00	44.83
2	23.53	33.82	42.65	32.73	25.45	41.82
3	13.10	25.48	71.43	45.65	13.59	40.76
4	23.86	43.35	32.78	55.51	15.57	28.92
5	26.14	38.50	35.36	52.53	11.11	36.36
6	23.43	37.13	39.44	56.04	9.13	34.82
7	21.74	38.50	39.76	56.25	19.00	24.75
8	29.30	49.01	21.69	63.52	22.13	14.34
PROMEDIO	22.00	38.86	40.39	49.68	17.00	33.33
±SD	5.45	7.27	14.16	10.90	5.62	10.17

Anexo N° 8. Porcentajes de las tres poblaciones caracterizadas por DBA-FITC antes y después del enriquecimiento con Percoll evaluadas por Citometría de Flujo.

MUESTRA	Pre Percoll			Post Percoll		
	sDBA+	wDBA+	DBA-	sDBA+	wDBA+	DBA-
9	35.1	39.5	25.4	78.2	20.6	1.3
10	73.0	24.9	2.1	96.4	3.2	0.4
11	40.9	56.1	3.0	80.0	18.9	1.1
12	37.1	53.2	9.7	80.3	18.6	1.1
PROMEDIO	46.52	43.42	10.06	83.72	15.31	0.97
±SD	17.84	14.32	10.81	8.50	8.13	0.37

sDBA+: strong DBA positivas (Células madre espermatogoniales).

wDBA+: weak DBA positivas (Células en vías de diferenciación).

DBA-: DBA negativas (Células diferenciadas).

SD: Desviación estándar

Anexo N° 9. Porcentaje de viabilidad celular durante los días 3 y 6 del cultivo.

MUESTRA	PORCENTAJE DE VIABILIDAD DIA 3				PORCENTAJE DE VIABILIDAD DIA 6			
	CONTROL	PERCOLL	GELATINA	DBA	CONTROL	PERCOLL	GELATINA	DBA
1	88.83	76.52	70.99	74.23	89.19	74.82	67.72	76.5
2	90.79	81.43	68.03	85.16	67.74	75.4	65.43	79.66
3	90.91	78.79	82.5	78.95	71.17	69.57	66.04	74.87
4	69.9	78.26	75.45	80	75.98	64	74.86	81.73
5	77.91	77.18	75.82	75.89	79.47	66.67	79.19	84.8
9	76.34	78.95	71.43	80.6	64.84	82.14	66.67	75.49
10	87.29	82.01	77.56	78.38	73.91	80.15	60.91	58.33
11	82.64	77.61	78.57	75	84.66	82.73	68.7	66.67
PROMEDIO	83.08	78.84	75.04	78.53	75.87	74.44	68.69	74.76
±SD	7.72	1.96	4.69	3.56	8.29	7.12	5.75	8.56

SD: Desviación estándar

Anexo N° 10. Porcentaje de células espermatozonales (sDBA+) después de 8 días de cultivo *In vitro* por Microscopía de fluorescencia

<i>MUESTRA</i>	<i>CONTROL</i>	<i>PERCOLL</i>	<i>GELATINA</i>	<i>DBA</i>
<i>sDBA+</i>				
<i>1</i>	47.57	55.30	40.32	62.60
<i>2</i>	40.35	51.61	46.38	71.88
<i>3</i>	47.43	59.34	50.86	62.01
<i>4</i>	38.64	45.16	45.86	61.86
<i>5</i>	40.22	47.41	41.15	59.11
<i>6</i>	57.85	49.79	45.83	70.24
<i>7</i>	41.03	49.51	48.61	54.58
<i>8</i>	42.76	60.94	51.86	63.98
<i>PROMEDIO</i>	44.48	52.38	46.36	63.28
<i>±SD</i>	6.34	5.64	4.14	5.61

Anexo N° 11. Porcentaje de células espermatozonales (sDBA+) después de 8 días de cultivo *In vitro* por Citometría De Flujo.

<i>MUESTRA</i>	<i>CONTROL</i>	<i>PERCOLL</i>	<i>GELATINA</i>	<i>DBA</i>
<i>sDBA+</i>				
<i>9</i>	35.4	82.6	48.5	75.5
<i>10</i>	48.6	65.0	32.4	59.8
<i>11</i>	39.6	47.6	56.2	56.3
<i>12</i>	86.8	36.6	75.1	76.0
<i>PROMEDIO</i>	52.60	57.95	53.05	66.90
<i>±SD</i>	23.44	20.20	17.73	10.34

sDBA+: strong DBA positivas (Células madre espermatozonales).

SD: Desviación estándar